

Primärstruktur der Hämoglobine unter besonderer Berücksichtigung der Fische

**Die Primärstrukturen der Hämoglobine
von Zitteraal (*Electrophorus electricus*)
und Zitterrochen (*Torpedo marmorata*)**

Felix Huber

Disbui. München

1988

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung Proteinchemie
Direktor: Prof. Dr. G. Braunitzer

**Primärstruktur der Hämoglobine
unter besonderer Berücksichtigung der Fische**

Die Primärstrukturen der Hämoglobine von
Zitteraal (*Electrophorus electricus*) und
Zitterrochen (*Torpedo marmorata*).

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Felix Huber
aus Bad Tölz
München 1988

1. Referent: Prof.Dr. G. Braunitzer

2. Referent: Prof.Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1988

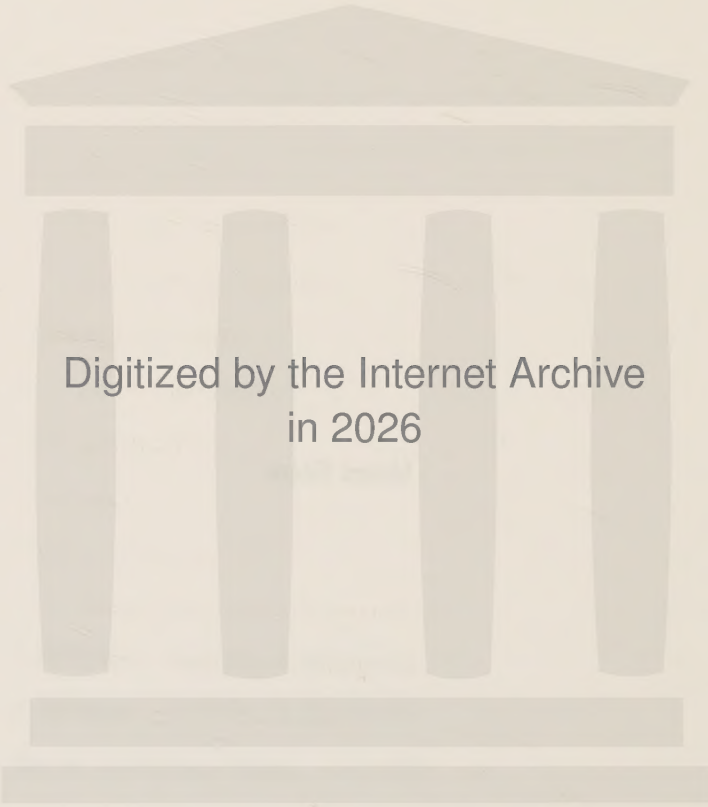
Thema: ...

Thema:

Thema:

- 1. ...
- 2. ...
- 3. ...
- 4. ...
- 5. ...
- 6. ...
- 7. ...
- 8. ...
- 9. ...
- 10. ...
- 11. ...
- 12. ...
- 13. ...
- 14. ...
- 15. ...
- 16. ...
- 17. ...
- 18. ...
- 19. ...
- 20. ...

Meinen Eltern.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555407_0028

Inhaltsangabe

Einleitung	1
Material und Methoden	3
1. Gewinnung der Hämoglobine	3
2. Häm-Abspaltung	4
2.1 Methode nach Rossi-Fanelli	4
2.2 Methode nach Teale	4
3. Komponententrennung	5
4. Kettentrennung	7
4.1 mittels CM-Cellulose	7
4.2 mittels HPLC	7
5. Elektrophoresen	9
5.1 Disk-Elektrophorese	9
5.2 Triton-Elektrophorese	9
5.3 SDS-Elektrophorese	10
5.4 Dünnschicht-Elektrophorese	10

6. Spaltung der α- und β-Ketten	11
6.1 Enzymatische Spaltung	11
6.1.1 mittels Trypsin	11
6.1.2 mittels Protease V8 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	11
6.2 Chemische Spaltung	12
6.2.1 Asp-Pro-Spaltung	12
6.2.2 Arg-Spaltung	12
6.2.3 Tryptophan-Spaltung	12
6.2.4 Bromcyan-Spaltung	13
7. Trennung der Peptide	13
7.1 mittels Gelfiltration	13
7.2 mittels HPLC	14
8. Analysen	15
9. Sequenz-Analysen	16
9.1 mittels Flüssigphasen-Sequenzierung	16
9.2 mittels Gasphasen-Sequenzierung	18
9.3 mittels Massenspektroskopie	20

Ergebnisse	21
10. Primärstruktur der Hämoglobine	21
10.1 Komponententrennung	21
10.1.1 Zitteraal (<i>Electrophorus electricus</i>)	21
10.1.2 Zitterrochen (<i>Torpedo marmorata</i>)	22
10.2 Kettentrennung	23
10.2.1 Zitteraal	23
10.2.2 Zitterrochen	26
10.3 Trennung der Peptide	27
10.3.1 Zitteraal	27
10.3.2 Zitterrochen	33
11. Gasphasensequenzierung	41
Tabellen	44
Tabelle 1: Sequenztabelle Zitteraal-Hämoglobin	44
Tabelle 2: Sequenztabelle Zitterrochen-Hämoglobin	45
Tabelle 3: Analysentabelle Zitteraal α -Ketten	46
Tabelle 4: Analysentabelle Zitteraal β -Ketten	47
Tabelle 5: Analysentabelle Zitterrochen α -Ketten	48
Tabelle 6: Analysentabelle Zitterrochen β -Ketten	49
Tabelle 7: Sequenzierschema Zitterrochen α -Ketten	50
Tabelle 8: Sequenzierschema Zitterrochen β -Ketten	51

Diskussion	52
Physiologie und Morphologie	55
Root-Effekt	58
Bohr-Effekt	61
Hämtasche	64
Effekt organischer Phosphate	71
Evolution	75
Zusammenfassung	78
Literatur	79

Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat

CM = Carboxymethyl

DPG = 2,3-Diphosphoglycerat

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography

GTP = Guanosintriphosphat

Hb = Hämoglobin

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

PITC = Phenylisothiocyanat

PTH = Phenylthiohydantoin

Propin = 3-Diethylaminopropin

Quadrol = N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin

RP = Reversed Phase

Reagenz I = 1-(Isothiocyanato)benzol-4-sulfonsäure, Natriumsalz

Reagenz IV = 7-(Isothiocyanato)naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure, Natriumsalz

R = Reagent

S = Solvent

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA = Trifluoressigsäure

Tp = Tryptisches Peptid

Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan



Einleitung

Die Fische sind die älteste und artenreichste Klasse unter den Wirbeltieren; ihr Erscheinen läßt sich anhand von fossilen Funden auf ca. 550 Millionen Jahre zurückdatieren. Mit der Evolution der Vertebraten wurden immer größere Ansprüche an die sauerstoffübertragenden Proteine gestellt, was dazu führte, aus den ursprünglichen, einfachen Monomeren komplex gebaute tetramere Moleküle zu bilden. Durch diese "Neuentwicklung" wird eine Beeinflussbarkeit der Sauerstoffaffinität durch kleine Moleküle, sog. "Effektoren", erreicht, wodurch der Sauerstoffdruck in der Zelle reguliert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Besonderheiten der Regulation der Sauerstoffaffinität im Blut von Fischen zu untersuchen.

Die Ordnung der Fische kann man in vier Klassen einteilen, von denen zwei als ausgestorben gelten ⁽¹⁾. Die zwei verbleibenden Klassen (*Knorpelfische* und *Knochenfische*) unterscheiden sich infolge des großen Evolutionszeitraumes stark voneinander. Der gravierendste Unterschied, weil am folgenreichsten, ist die Entwicklung der Schwimmblase, die den Knochenfischen einen großen Vorteil bietet: durch die Möglichkeit der Sauerstoffsezerernierung in der Schwimmblase entgegen äusseren Drucken ist das spezifische Gewicht regulierbar, d.h. um sich in bestimmter Wassertiefe aufhalten zu können, müssen keine aktiven Schwimmbewegungen durchgeführt werden. Darüberhinaus dient die Schwimmblase manchen Fischarten als Sauerstoffreservoir ⁽¹⁾. Als typischer Vertreter aus der

Klasse der Knochenfische wurde der Zitteraal (*Electrophorus electricus*) gewählt, dessen Blut nicht ungewöhnliche physiologische Meßdaten aufweist und aus nur einer Komponente besteht. So verfügt er, wie alle Karpfenartigen, über eine Schwimmblase und zeigt kräftigen Bohreffekt.

Hingegen zeigt der der Klasse der Knorpelfische zugehörige Zitterrochen (*Torpedo marmorata*) ziemlich ungewöhnliche Blutwerte und eine polygene Zusammensetzung hinsichtlich der Anzahl der Komponenten, wie auch der Aminosäuresequenzen.

So war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich, die Sequenz der beiden α -Ketten zu komplettieren und die der β -Ketten zu bestimmen. Diese Sequenzen zeigen Austausche in Positionen, die die ungewöhnlichen physiologischen Meßwerte des Blutes erklären: insbesondere konnte das Fehlen des Bohreffektes erstmals molekular gedeutet werden.

Methodisch wurden neuartige HPLC-Verfahren entwickelt, um schwer zu trennende Proteine zu isolieren; weiterhin konnten in der Analytik des Gasphasensequenzierens zwei neue Puffersysteme erprobt werden, welche einfacher zu handhaben sind als das bis dato Benutzte.

Material und Methoden

1. Gewinnung der Hämoglobine

Da sowohl Zitteraal wie auch Zitterrochen wegen ihrer elektrischen Organe zur Gewinnung von Neurotransmittern sehr häufig verwendet werden, war es relativ einfach, Blut des entsprechenden Tieres zu bekommen.

Eine große Menge von mit Heparin versetzten Erythrozyten des Zitteraals konnte aus Dortmund (Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Prof. Mälicke) bezogen werden; ca. 10 ml der zäh-viskosen Lösung wurden portionsweise mit hypertotonischer Kochsalzlösung (1.5 %) mehrfach gewaschen und abzentrifugiert. Dann wurde die doppelte Menge Aqua bidest. hinzugefügt, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach dem Abzentrifugieren der festen Zellbestandteile wurde die Hämoglobinlösung mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt, um vorhandene Lipide zu entfernen. Zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes wurden 20 μ l Hb-Lösung mit 4 ml Transformationslösung (0.16% $K_3(Fe(CN)_6)$ und 0.16% KCN in Wasser) 15 min inkubiert und bei 540 nm vermessen⁽²⁾.

Globin vom Zitterrochen stand anfangs noch zur Verfügung⁽³⁾; gegen Ende der vorliegenden Arbeit konnte aus Göttingen (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Whittacker) frisches Blut bezogen werden. Mit den Erythrozyten wurde wie oben beschrieben verfahren. Nicht benötigtes Material wurde bei $-70^{\circ}C$ aufbewahrt.

2. Häm-Abspaltung

2.1 Methode nach Rossi-Fanelli⁽⁴⁾

Um Globin zu gewinnen, wurde die jeweilige Hb-Lösung (Konzentration 5-10 %) unter stetigem Rühren in einen 20-fachen Überschuß von auf -18°C gekühltes salzsaures Aceton getropft. Hierbei blieb nur das Häm in Lösung, das Globin fiel als feiner weißer Niederschlag aus. Die kalte Acetonlösung wurde zentrifugiert, der Niederschlag mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen und das so erhaltene Globin in wenig Wasser aufgenommen. Nach ca. 12stündiger Dialyse gegen verdünnte Essigsäure wurde das Globin lyophilisiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2 Methode nach Teale⁽⁵⁾

Zur Gewinnung kleinerer Mengen Globin ist die Methode nach Teale günstiger; hierzu wurde die verdünnte, gekühlte Hb-Lösung mit 0.5 N HCl auf pH 2 titriert und sofort mit dem doppelten Volumen kaltem Ethylmethylketon ausgeschüttelt. Die das Globin enthaltende wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt, wie oben dialysiert und lyophilisiert.

3. Komponententrennung

Um die Frage zu klären, aus wievielen Komponenten das Blut des Zitteraales bzw. des Zitterrochens besteht, wurden die frisch zubereiteten Hb-Lösungen stark verdünnt (Konzentration ca. 1 mmol) und sorgfältig zentrifugiert.

Gearbeitet wurde am Ultrochrom GTi Bioseparation System (Fa. LKB), die Integration erfolgte mit einem CR2AX Chromatopack (Fa. Shimadzu).

Für die Hb-Lösung des Zitteraales fand eine Anionenaustauschersäule (DEAE 5PW 8x75mm, Fa.LKB) Verwendung; als Puffer A diente 20mM Tris-Lösung, die mit konz. HCl auf pH 8.5 eingestellt worden war, als Eluent (Puffer B) wurde 1 M NaCl/Puffer A benutzt. Der angelegte Gradient war annähernd linear (0% B 5 min, 0-10% B in 10 min, 10-25% B in 20 min), die Flußrate betrug 0.5 ml/min; die Extinktion wurde bei 410 nm gemessen (range: 0.64, attenuation: 3, speed: 2). Eingespritzt wurden 10µl der stark verdünnten Hb-Lösung.

Für das Hämoglobins des Zitterrochens wurde zur Komponententrennung ein Kationenaustauscher gewählt (TSK SP-5PW 8x75mm, Fa. LKB). Puffer A bestand aus 20 mM NaH_2PO_4 (pH 4.9), Puffer B aus 1 M NaCl/Puffer A. Auch hier wurde ein linearer Gradient gewählt (0 % B für 10 min, 0-100 % B in 120 min), Flußrate 0.5 ml/min, Detektion bei 410 nm (range: 1.28, attenuation: 3, speed: 2). Eingespritzt wurden 10 µl der Hb-Lösung.

Da das Komponentenmuster des Zitterrochens sehr diffus aussah, wurde die verdünnte native Hb-Lösung mittels Transformationslösung ligandiert, um Unklarheiten betreffend der Einheitlichkeit der Komponenten auszuschließen.

4. Kettentrennung

4.1 mittels CM-Cellulose⁽⁶⁾

Zitteraalglobin erwies sich im Gegensatz zum Globin des Zitterrochens⁽⁷⁾ mittels eines Kationenaustauschers (CM 52, Fa. Whatman) als trennbar. 100 mg Globin wurden in 5 ml Startpuffer gelöst und nach Zugabe von 60 mg DTE auf die Säule (12x2.5 cm) aufgetragen. Als Puffer diente eine Lösung von 8 M Harnstoff, 0.05 M Natriumacetat und 0.01 % DTE; mit konz. HCl wurde pH 5.5 eingestellt. Als Gradient wurde eine 0.1 M NaCl/Puffer-Lösung eingesetzt, welcher (nach 30 min isokratischem Vorlauf) innerhalb von 60 min linear von 0 auf 100 % erhöht wurde. Die Flußrate betrug 35 ml/h.

Die Entsalzung der Ketten erfolgte auf Sephadex G-25 medium in 1 N Essigsäure (120x2.5 cm) bei einer Flußrate von 100 ml/h.

4.2 mittels HPLC

Um optimale Trennungen zu erzielen, wurden die Parameter Säulenlänge, Füllmaterial, Lösungsmittel und Temperatur variiert. Versuche wurden mit Hämoglobin wie auch mit Globin (oxidiert und nativ) durchgeführt. Die präparative Trennung der α - und β -Ketten des Zitteraales konnte mit nativem Globin und den üblichen Puffern durchgeführt werden, die weit schwierigere Kettentrennung beim Zitterrochen erfolgte mit verdünnter Hämoglobinlösung und einem speziell entwickelten Puffergemisch.

Apparativ standen verschiedene Geräte der Firma Beckman zur Verfügung (z.B. Gradient Liquid Chromatograph Model 334 und Controller 421, HPLC-Pumpen 112), detektiert wurde mit dem Durchflußphotometer BT 3030 (Fa. Biotronik) und integriert mit einem Chromatopack CR2AX (Fa. Shimadzu).

Die Säulen (verschiedene Längen, von 40x4.6 mm bis 250x4.6mm, Fa. Knauer bzw. Fa. Bischoff) wurden mit einem Shandon Packgerät (Fa. Gynkotheke) selbst gefüllt; um den Einfluß der Temperatur auf die Trennungen zu erforschen, wurden einige Säulen mit Heizmänteln ausgestattet.

Als Säulenmaterial wurden verwendet:

LiChrosorb RP 2 (Fa. Merck)

Nucleosil C4 (Fa. Macherey u. Nagel)

Vydac RP 18 (Fa. Macherey u. Nagel)

Als Puffer fanden Verwendung:

5 bzw. 10%ige Ameisensäure, 0.05 M Ammoniumacetat

1.5 bzw. 5%ige Ameisensäure, 0.03 bzw. 0.1 M Pyridin

organischer Eluent: Acetonitril

Getrennt werden konnten maximal 4 mg Globin (Zitteraal), bzw. 2 mg Hämoglobin (Zitterrochen). Die Gradienten wurden dem jeweiligen Trennproblem angepaßt.

5. Elektrophoresen

5.1 Disk-Elektrophorese⁽⁸⁾

Unter nativen Bedingungen wurde die Anzahl der Hämoglobinkomponenten der Fischhämoglobine ermittelt.

Das 10%ige Polyacrylamidgel hatte folgende Zusammensetzung:

4.5% Tris/1 N HCl, 0.06% N,N'-Tetramethyldiamin, 10% Acrylamid-Bisacrylamid und 0.04% Ammoniumperoxodisulfat. Die Polymerisation der entlüfteten Lösungen war innerhalb einer Stunde abgeschlossen; als Puffer diente 0.07 M Tris/Glycin (pH 8.3), pro Rundgel (5x75 mm) wurde ein Stromfluß von 4.5 mA angelegt; die Elektrophorese dauerte jeweils 1 Stunde.

Pro Gel wurden 0.02 mg Hb aufgetragen. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit 1%iger Amidoschwarz-10B-Lösung in 7%iger Essigsäure, überschüssiger Farbstoff wurde mit 7%iger Essigsäure entfernt.

5.2 Triton-Elektrophorese⁽⁹⁾

Unter denaturierenden Bedingungen wurde die Anzahl der Ketten des Hämoglobin bestimmt. Das Polyacrylamidgel hatte folgende Zusammensetzung:

10% Acrylamid-Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 5% Essigsäure, 2% Triton X-100 und 0.04% Ammoniumperoxodisulfat. Die Polymerisation der entlüfteten Lösung dauerte 16 Stunden.

Pro Rundgel (5x75 mm) wurden 0.02 mg der jeweiligen Probe, gelöst

in Probenpuffer (8 M Harnstoff, 8% Essigsäure, 8% Mercaptoethanol), aufgetragen; die Elektrophoresendauer betrug ca. 4 Stunden bei einer Spannung von 140 Volt. Als Elektrodenpuffer diente 5%ige Essigsäure, die Anfärbung erfolgte wie unter 5.1 beschrieben.

5.3 SDS-Elektrophorese⁽¹⁰⁾

Um ein nur schwer abtrennbares Protein (5-10% der Gesamtproteinmasse) von Hämoglobin unterscheiden zu können, wurde das Molekulargewicht aller Proben unter denaturierenden Bedingungen bestimmt.

Die Zusammensetzung der Rundgele (5x75 mm) war wie folgt:

8% NaH_2PO_4 , 40% Na_2HPO_4 , 2% SDS, 10% Acrylamid-Bisacrylamid und 0.04% Ammoniumperoxodisulfat. Die Polymerisation erfolgte innerhalb 15 Stunden.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 2 Stunden bei 37°C mit einem 0.01 M Natriumphosphatpuffer (pH 7)/ 1% SDS/ 1% Mercaptoethanol inkubiert; die Elektrophorese erfolgte analog wie unter 5.2 beschrieben.

5.4 Dünnschicht-Elektrophorese

Die Reinheit der Peptide wurde durch ihre Wanderung im elektrischen Feld untersucht. Zur Trennung wurden cellulosebeschichtete DC-Fertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt) benutzt, als Puffer diente eine wässrige Lösung aus 5% Aceton und 5% Pyridin (eingestellt mit Essigsäure auf pH 5.4)). Die Bedingungen der Elektrophorese: ca. 450 V, Dauer 1 1/2 Stunden.

Die Detektion erfolgte mittels Ninhydrin-Reagenz (60% Ethanol, 20% Essigsäure, 8% Collidin und 0.1% Ninhydrin)⁽¹¹⁾, einige Aminosäurereste konnten durch spezifische Farbreaktionen nachgewiesen werden: Tyrosin und Histidin durch Diazotierung⁽¹²⁾, Arginin durch Reaktion mit Phenanthrenchinon⁽¹³⁾ und Tryptophan durch Umsetzung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd⁽¹⁴⁾.

6. Spaltung der α - und β -Ketten

6.1 Enzymatische Spaltung

6.1.1 mittels Trypsin⁽¹⁵⁾

Das Kettenmaterial (2-8 mg) wurde in stark verdünntem Ammoniak aufgenommen und bei pH 10.5 mit 2.5% Trypsin (TPCK, Fa. Worthington) unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 Stunde wurde mit Essigsäure der pH auf 9.5 abgesenkt und die Probe nochmals mit 2.5% Trypsin versetzt. Durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure wurde die Reaktion abgebrochen; ausgefälltes Coreprotein wurde abzentrifugiert und wie die löslichen Peptide bei -70°C aufbewahrt.

6.1.2 mittels Protease V8 (Staphylococcus aureus)⁽¹⁶⁾

Die Spaltbedingungen wurden so gewählt, daß nur an Glutaminsäureresten C-terminal gespalten wurde: in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 7.8) wurden 1 mg β -Ketten (Zitterrochen) bzw. 100 nM des entsprechenden Arginylpeptides 16 Stunden bei Raumtemperatur mit 1/25 der Menge an Enzym inkubiert, das Hydrolysat bei -70°C aufbewahrt.

6.2 Chemische Spaltung

6.2.1 Asp-Pro-Spaltung⁽¹⁷⁾

Kettenmaterial (5-10 mg) wurde in 6 M Guanidinhydrochlorid/70% Ameisensäure (max. 1 ml) gelöst und 72 Stunden bei 42°C inkubiert.

6.2.2 Arg-Spaltung⁽¹⁸⁾

Kettenmaterial wurde mit Citraconsäureanhydrid umgesetzt, um die ϵ -Aminogruppen der Lysine zu blockieren. Hierzu wurden 6 mg des Proteins in 3 ml 6 M Guanidinhydrochlorid gelöst und mit Triethanolamin auf pH 9.6 titriert. Während der portionsweisen Zugabe von 50 mg Citraconsäureanhydrid (1:1 verdünnt mit Dioxan) wurde der pH-Wert mit 2.5 N NaOH konstant gehalten. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wurde der Ansatz mit 3 ml 8 M Harnstoff verdünnt und über Sephadex G-25 (2.6x120 cm) in 0.1% Ammoniak entsalzt und anschließend lyophilisiert.

Das citraconylierte Kettenmaterial wurde in 1 ml 0.01 N NaOH aufgenommen und tryptisch gespalten (siehe 6.1.1), die anschließende Deblockierung erfolgte durch 2-tägige Inkubation in 2 ml 50%iger Ameisensäure.

6.2.3 Tryptophan-Spaltung⁽¹⁹⁾

Kettenmaterial (5 mg) wurde in 0.5 ml einer Lösung von 10 mg o-Jodosobenzoesäure in 4 M Guanidinhydrochlorid/80 %iger Essigsäure aufgenommen und im Dunkeln bei Raumtemperatur 24 Stunden inkubiert.

6.2.4 Bromcyan-Spaltung⁽²⁰⁾

Bei den β -Ketten des Zitterrochens war in Ermangelung einer Asp-Pro-Bindungsstelle eine Spaltung am Methionin (Pos. G 6) nötig. Da die α -Ketten kein Methionin enthalten, wurden 200 mg natives Globin mit einem ca. 100 fachen Überschuß (bezogen auf Methionin) Bromcyan in 70 %iger Ameisensäure 5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Hydrolysat wurde mehrmals mit Aqua bidest. aufgenommen, einrotiert und lyophilisiert.

7. Trennung der Peptide

7.1 mittels Gelfiltration

Die Vortrennungen der tryptischen Hydrolysate erfolgte auf einer Sephadex-G-25-Säule (2.6x160 cm) in 0.1 M Essigsäure bei einer Flußrate von 15 ml/h, detektiert wurde bei 230 nm.

Die aus der Spaltung mittels *Staphylococcus aureus* V8-Protease gewonnen Peptide wurden auf TSK-Gel (G 2000 SW, 4.6x600 mm) in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 7.8) bei einer Flußrate von 0.5 ml/h getrennt, die Detektion erfolgte bei 230 nm.

Die unter denaturierenden Bedingungen gespaltenen Peptide (Asp-Pro-Spaltung und Bromcyanspaltung, 6.2.1 bzw. 6.2.4) wurden auf einer Sephadex-G-50-Säule (fine, 2.6x180 cm) in 8 M Harnstoff/10 %iger Ameisensäure getrennt; der Durchfluß betrug ca. 20 ml/h, detektiert wurde bei 280 nm.

Entsalzt wurde mit Sephadex-G-25-Säulen verschiedener Länge (je nach Volumen der zu entsalzenden Probe) in 0.1 M oder 1 M Essigsäure; bei sehr hydrophoben Peptiden fand eine Biogel-P4-Säule (2.6x100 cm) in 10 %iger Ameisensäure Anwendung.

7.2 mittels HPLC⁽²¹⁾

Zur Trennung der Peptide kamen verschiedene Trennmaterialien und Puffergemische zur Anwendung:

LiChrosorb RP 2 und Rp 18 (Fa. Merck), als wässrige Phase
diente 0.1 M Ammoniumacetat oder 0.1% TFA,

Nucleosil C 4 (Fa. Macharey und Nagel), mit 0.1% TFA
oder 0.1 M Ammoniak,

Vydac RP 18 (Fa. Macharey und Nagel), mit 0.1% TFA
als wässrige Phase.

Als Eluent wurde in allen Fällen Acetonitril verwendet; die apparative Ausstattung war wie unter 4.2 beschrieben. Die Detektion erfolgte bei 230 nm bzw. 280 nm; die Flußrate und der Gradientenverlauf wurden dem jeweiligen Trennproblem angepaßt und sind den Legenden der jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Für spezielle Trennprobleme wurden verkürzte Säulen benutzt. Um eine Erhöhung der Ausbeute und eine verbesserte Trennschärfe zu erzielen, wurden einige Säulen mit einem Heizmantel ausgestattet und mit einem Thermostaten beheizt.

8. Analysen

Zur Bestimmung der Bruttoformeln⁽²²⁾ wurden 2 nmol Peptid bei 110°C unter Vakuum mit 5.7 N HCl hydrolysiert (20 bzw. 200 Std.); Peptide, die Tryptophan enthielten, wurde 6% Thioglycolsäure hinzugefügt⁽²³⁾, Cystein- und Methioninhaltige Peptide wurden vor der Hydrolyse mit Perameisensäure oxidiert.

Die Proben wurden bis zur Trockene einrotiert, in Citratpuffer (pH 2.2) aufgenommen und im automatischen Aminosäureanalysator (Model LC 5000, Fa. Biotronik) untersucht. Von einer Kationenaustauschersäule (sulfonierte Polystyrolmatrix) wurden mittels eines diskontinuierlichen Puffer- (fünf Puffer von pH 3.45 bis pH 10.5) und Temperaturgradienten (von 48-70°C) die Aminosäuren entsprechend ihrer unterschiedlichen Retentionszeit eluiert. Die Detektion erfolgte durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin bei 570 nm (alle Aminosäuren) bzw. 440 nm (Prolin). Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 0.3 N NaOH regeneriert.

9. Sequenz-Analysen

9.1 mittels Flüssigphasen-Sequenzierung

Das Sequenzieren der Ketten, sowie das Sequenzieren längerer Peptide (größer als 20 Aminosäurereste) erfolgte in automatischen Flüssigphasen-Sequenzatoren (Fa. Beckman, Typen 890 B, 890 C und 890 C II) nach Edman⁽²⁴⁾. Pro Lauf wurden zwischen 10 und 50 nmol eingesetzt, wobei zwei Programme zur Anwendung kamen:

Quadrolprogramm: für Lysylpeptide.

Die Lysinreste wurden mit Reagens IV (7-(Isothio-cyanato)naphtalin-1,3,5,-trisulfonsäure Na-Salz)⁽²⁵⁾ modifiziert, als Kupplungspuffer wurde Quadrol⁽²⁶⁾ verwendet.

Propinprogramm: für Arginyl-, sowie lange hydrophobe Peptide.

Hydrophobe Peptide wurden mit Reagens I (4-(Isothio-cyanato)-benzolsulfonsäure Na-Salz)⁽²⁷⁾ umgesetzt, als Kupplungspuffer diente Diethylaminopropin⁽²⁸⁾.

Die Konversion erfolgte mit 25%iger TFA im Autokonverter (Sequemat P-6, Fa. KontronTechnik GmbH) bei 60°C, bzw. manuell bei 80°C.

Die Identifizierung der PTH-Aminosäurederivate erfolgte mit zwei verschiedenen HPLC-Systemen:

I. Stufengradientenelution⁽²⁹⁾ (HPLC:1084B Liquid Chromatograph, Fa. Hewlett Packard)

Säule: ODS-Hypersil (Fa. Shandon), 4.6x250 mm

Flußrate: 1.2 ml/min bei 60°C

Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat, pH 4.8

Puffer B: Acetonitril

Gradient: Start mit 10% B

nach 1 Min. 20% B

nach 5 Min. 45% B

nach 14 Min. 70% B

nach 19 Min. 10% B

Detektiert wurde mit multichromatischem Licht bei 265 nm gegen 325 nm, Ser und Thr erschienen dabei als negative Gipfel.

II. Isokratische Elution⁽³⁰⁾ (HPLC-System aus Teilen verschiedener Hersteller)

Säule: LiChrosorb RP18 (Fa. Merck), 4.6x250 mm

Flußrate: 1.7 ml/min bei 63°C

Puffer: 685 ml 0.02 M Natriumacetat pH 5.2

315 ml Acetonitril

Wasser ad 1000 ml

Detektion erfolgte bei 265 nm gegen 320 nm, Ser und Thr erschienen als negative Gipfel.

9.2 mittels Gasphasen-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der kürzeren Peptide (bis 28 Aminosäuren) wurde in einem Gasphasensequenzator durchgeführt, welcher unter Anleitung von G. Begg⁽³¹⁾ im Hause gebaut worden war. Die Methode des Abbaues ähnelte der von Hunkapiller⁽³²⁾ beschriebenen.

Anstelle des schwer handhabbaren Trimethylamins wurden Versuche mit anderen tertiären Aminen gemacht; aufgrund des Siedepunktes und des pK-Wertes fiel die Wahl auf N,N-Dimethylallylamin und 3-(Dimethylamino)propin⁽³³⁾. Zunächst wurde die Menge der pro Kupplungsschritt nötigen Base mittels Titration bestimmt. Dann wurden wässrige Lösungen der Amine in verschiedener Konzentration (zuerst bei Raumtemperatur, später thermostatiert bei 40°C) eingesetzt, um die optimale Zusammensetzung zu ermitteln.

An Chemikalien wurden verwendet:

Sequenzator:

R 1: 10%ige Lösung von Phenylisothiocyanat in Hexan,

R 2: 2 M tert. Amin in Wasser,

R 3: TFA (Wasserfrei),

S 1: Hexan/Benzol (1:1),

S 2: Essigsäureethylester,

S 3: Buthylchlorid.

Konverter:

S: 35% Acetonitril in Wasser + 0.25% TFA,

A: 25%ige wässrige TFA.

Als Trägergas wurde Argon verwendet.

Die als technische Produkte bezogenen Reagenzien und Lösungsmittel wurden wie folgt gereinigt:

- Phenylisothiocyanat: Destillation unter Vakuum, Aufbewahrung unter Argon bei -25°C ,
- tertiäre Amine: Rückflußkochen mit 5% Maleinsäureanhydrid, Dekantieren, Destillation über Vigreuxkolonne (DMAP unter Argon), Sdp. DMAA: 63°C , DMAP: 80°C ,
- Trifluoressigsäure: Rückflußkochen mit 5% Kaliumpermanganat, Dekantieren, Destillation über Vigreuxkolonne, Sdp.: 72°C ,
- Benzol: Ausfrieren bei 4°C ,
- Essigsäureethylester: Filtration mit Aktivkohle, Destillation über Füllkörperkolonne (Sdp.: 77°C), Trocknen mit Aluminiumoxid- und Molekularsiebsäule (unter Stickstoff).
- Butylchlorid: Filtration mit Aktivkohle, Destillation über Füllkörperkolonne (Sdp.: 78.6°C), Trocknen mit Molekularsiebsäule und Calciumsulfat (wasserfrei).
- Acetonitril und Hexan wurden von der Fa. Merck bezogen (Qualität: zur Chromatographie). Die gereinigten Amine wurden mit GC und NMR auf ihre Reinheit getestet.

Die Konvertierung wurde automatisch im eingebauten Konverter durchgeführt; die Identifizierung erfolgte wie unter 9.1 beschrieben.

Die Methode der Gasphasensequenzierung wurde wegen des geringen Probenbedarfes (untere Grenze ca. 200 pmol), sowie der hohen Abbaugeschwindigkeit (ca. 60 min/Schritt) auch zur Identifizierung von Peptidgemischen verwendet. Der Erfolg und die Ausbeute von den Asp-Pro-, Arginyl- sowie Bromcyan-Spaltungen konnte damit überprüft werden. Im Falle der Sequenzierung eines Prolylpeptides wurden zwecks Verringerung der Nebenspaltungsprodukte mit o-Phtaldialdehyd alle α -Aminogruppen blockiert⁽³⁴⁾.

9.3 mittels Massenspektroskopie

Von einigen Peptiden wurden mit der FAB-Methode⁽³⁵⁾ Massenspektren aufgenommen (Massenspektrometer CH 7A und MAT312, Fa. Varian/Finnigan, Datensystem SS200/NS).

Ergebnisse

10. Primärstruktur der Hämoglobine

10.1 Komponententrennung

10.1.1 Zitteraal (*Electrophorus electricus*)

Die Disk-Elektrophorese (siehe 5.1, ohne Abbildung) ergab nur eine Komponente; dies war insofern überraschend, als Hämoglobine anderer Aalarten aus mehreren Komponenten bestehen⁽³⁶⁾. Um dieses Ergebnis abzusichern, wurde auf die moderne Methode FPLC zurückgegriffen (siehe 3.). Die Trennung mittels eines Anionenaustauschers (DEAE 5PW) zeigte einen scharfen Gipfel.

Abbildung 1: Komponententrennung Zitteraal

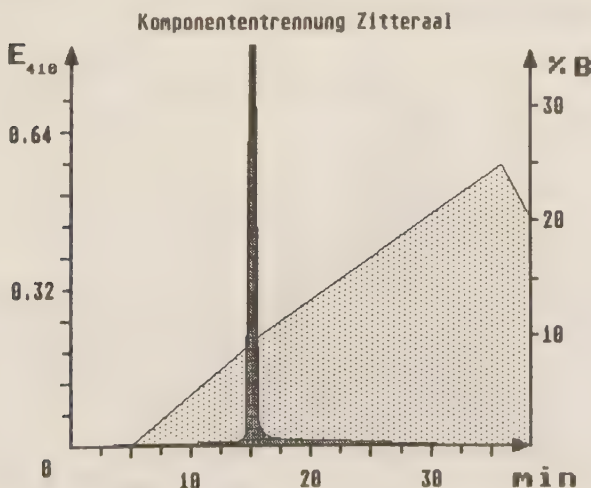


Abb. 1 Methode: FPLC
 Säule: Anionenaustauscher DEAE 5 PW, LKB, 8x75 mm
 Puffer A: 20 mM Tris, pH 8.5
 Puffer B: 20 mM Tris/1.0 M NaCl
 Durchfluß: 0.5 ml/min
 Probe: Hämoglobininlösung Zitteraal (verdünnt)
 Gradient: 5 min isokratisch
 in 10 min auf 10 % B
 in 20 min auf 25 % B
 Detektion bei 418 nm

Die Ausbeute dieser Methode liegt bei über 80%. Die Hämoglobinslösungen sind im Kühlschrank nur kurze Zeit stabil, so ergab ein 24 Stunden altes Hämolysat bereits eine Aufspaltung in drei Gipfel.

10.1.2 Zitterrochen (*Torpedo marmorata*)

Die Disk-Elektrophorese (siehe 5.1, ohne Abbildung) des Hämoglobins ergab eine Vielzahl von Banden⁽³⁷⁾, was sich mit Untersuchungen an Hämoglobinen anderer Knorpelfische deckt⁽³⁸⁾. Für die Komponententrennung mittels FPLC fand ein Kationenaustauscher (TSK SP-5PW) Verwendung (siehe 3.). Das Chromatogramm ergab ein uneinheitliches Bild voneinander mit dieser Methode nicht trennbarer Komponenten; das native und das ligandierte Hämoglobin ergaben ein identisches Spektrum.

Abbildung 2: Komponententrennung Zitterrochen.

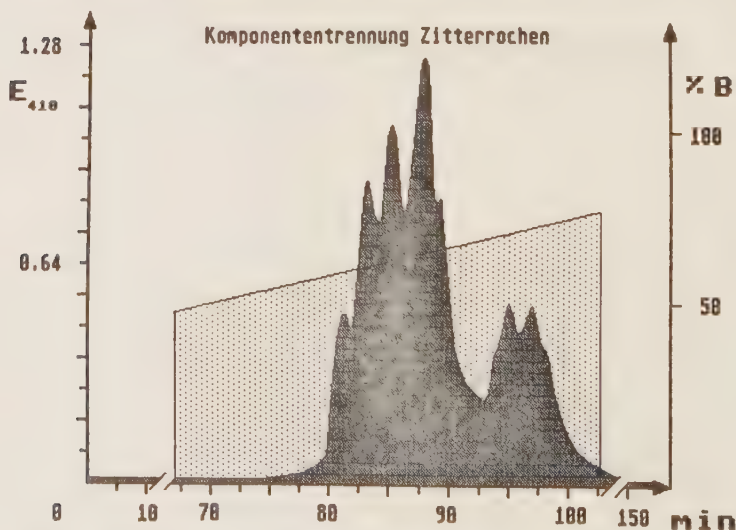


Abb. 2

Methode: FPLC
 Säule: Kationenaustauscher TSK SP-5 PW, LKB, 8x75 mm
 Puffer A: 20 mM NaH₂PO₄, pH 4.9
 Puffer B: 20 mM NaH₂PO₄/1.0 M NaCl
 Durchfluß: 0.5 ml/min
 Probe: Hämoglobinslösung Zitterrochen (verdünnt)
 Gradient: 10 min isokratisch
 in 120 min auf 100 % B
 Detektion bei 418 nm

10.2 Kettentrennung

10.2.1 Zitteraal

Die mittels Triton-Elektrophorese (siehe 5.2, ohne Abbildung) bestimmte Anzahl der Ketten (eine α - und eine β -Kette) bestätigte das Ergebnis der Komponententrennung. Die konventionelle Methode der Kettentrennung mittels Kationenaustauscher (CM-Cellulose, siehe 4.1) konnte wegen der niedrigen Ausbeuten (10-20%) und der schlechten Trennleistung nicht befriedigen. Statt dessen wurde versucht, eine optimale HPLC-Methode zu entwickeln (siehe 4.2). Nachteilig bei dieser Methode war die geringe Kapazität: es konnten maximal 200 nmol in einem Lauf getrennt werden.

Abbildung 3-6: Kettentrennung Zitteraal unter verschiedenen Bedingungen.

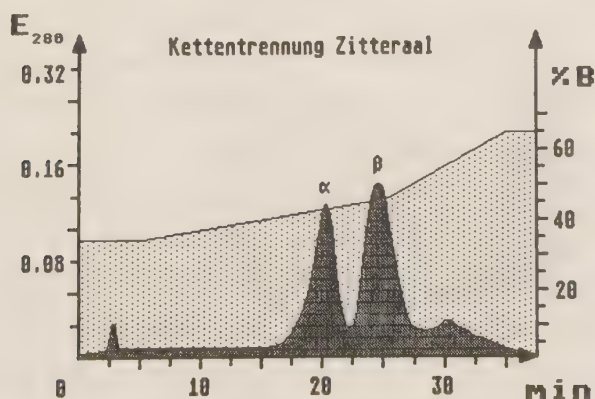


Abb. 3 Methode: HPLC
 Säule: LiChrosorb RP 2, Merck, 250x4.6 mm
 Puffer A: 0.05 M Ammoniumacetat/10 % Ameisensäure
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min Temperatur: 20°C
 Probe: Globin Zitteraal (50 nmol, nativ)
 Gradient: mit 35 % B äquilibrieren
 5 min isokratisch
 in 20 min auf 45 % B
 in 10 min auf 65 % B
 Detektion bei 280 nm

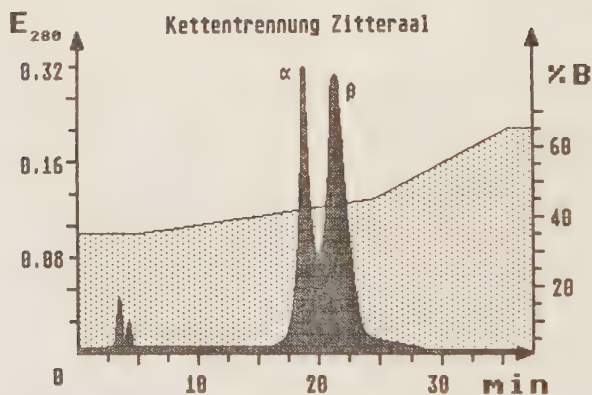


Abb. 4 Methode: HPLC
 Säule: LiChrosorb RP 2, Merck, 120x4.6 mm
 Restliche Parameter analog Abb. 3

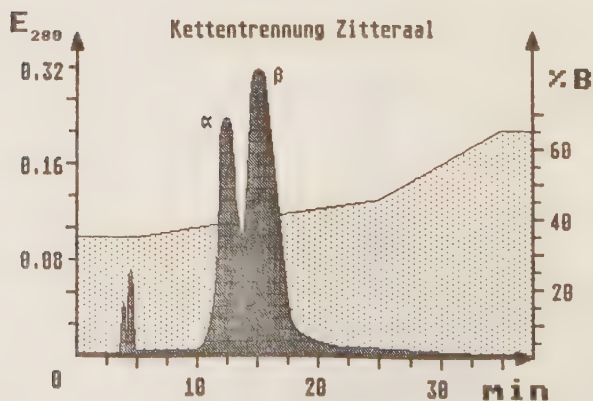


Abb. 5 Methode: HPLC
 Säule: Nucleosil C4, Macherey & Nagel, 250x4.6 mm
 Restliche Parameter analog Abb. 3

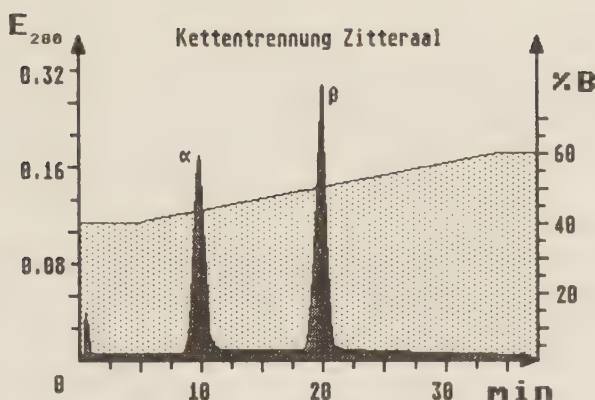


Abb. 6 Methode: HPLC
 Säule: Vydac RP 18, Macherey & Nagel, 60x4.6 mm
 Puffer A: 0.03 M Pyridin/0.3 M Ameisensäure
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min Temperatur: 20°C
 Probe: Globin Zitteraal (20 nmol, nativ)
 Gradient: mit 40 % B äquilibrieren
 5 min isokratisch
 in 30 min auf 60 % B
 Detektion bei 280 nm

Die Versuche mit den für Kettentrennungen etablierten Materialien (RP 2 und Nucleosil C4) waren nicht zufriedenstellend; die β -Ketten waren stets mit ca. 20% α -Ketten verunreinigt. Hingegen war eine gute Trennung mit einer 6 cm langen Vydac-(RP 18)-Säule möglich, wobei eine zusätzliche Verbesserung durch die Benutzung eines pyridinhaltigen Puffers erzielt wurde (Abbildung 6), der bislang nur für Chromatographie mit Ionenaustauschern⁽³⁹⁾ verwendet wurde. Möglicherweise vermindert das Pyridin die hydrophoben Wechselwirkungen der α - und β -Untereinheiten. Die Ausbeuten lagen zwischen 50 und 60%.

10.2.2 Zitterrochen

Die Triton-Elektrophorese (siehe 5.2) war für die genaue Bestimmung der Anzahl der Ketten unbrauchbar, so haben die verschiedenen α -Ketten die gleiche Retentionszeit⁽⁴⁰⁾ (ohne Abbildung).

Die Trennung mittels CM-Cellulose (siehe 4.2) erwies sich wegen der hohen Aggregationsneigung des Globins als nicht durchführbar. Statt dessen wurde für analytische Zwecke eine 6 cm lange Vydac--Säule benutzt (wie Kettentrennung Zitteraal, ohne Abbildung), zur Trennung größerer Mengen fand eine präparative Nucleosil-C4-Säule Verwendung. Das Puffergemisch war in beiden Fällen pyridinhaltig.

Abbildung 7: Kettentrennung Zitterrochen.

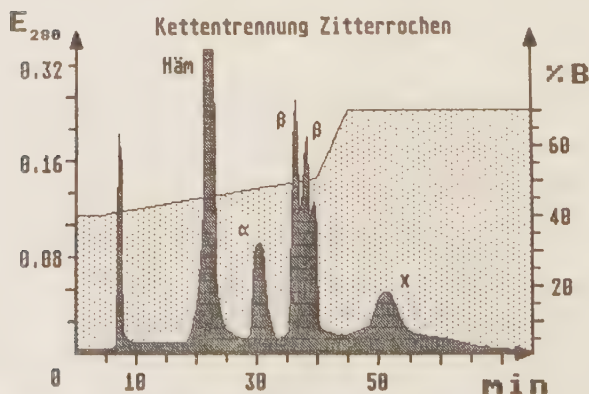


Abb. 7

Methode: HPLC
 Säule: Nucleosil C4, Macherey & Nagel, 280x8 mm
 Puffer A: 0.1 M Pyridin + 1.0 M Ameisensäure
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min Raumtemperatur
 Probe: Hämoglobin Zitterrochen (200 nmol)
 Gradient: mit 40 % B äquilibrieren
 5 min isokratisch
 in 35 min auf 50 % B
 in 5 min auf 60 % B
 Detektion bei 280 nm

x = Verunreinigung (vermutlich Kohlensäureanhydrase)

Bei Gipfelfraktion x handelte es sich vermutlich um höhere Aggregate, die nach dem Lyophilisieren nicht mehr löslich waren. Es erwies sich als undurchführbar, die verschiedenen α - bzw. β -Untereinheiten voneinander zu trennen; die jeweiligen Ketten wurden gemeinsam weiterverarbeitet.

10.3 Trennung der Peptide

10.3.1 Zitteraal

Zitteraal α -Ketten

Die Spaltung verlief wie unter 6.1.1 beschrieben. Das tryptische Hydrolysat wurde einer Vortrennung unterworfen, die einzelnen Fraktionen wurden mittels HPLC (RP 2) nachgereinigt (siehe 7.1 und 7.2).

Abbildung 8: Vortrennung des tryptischen Hydrolysats.

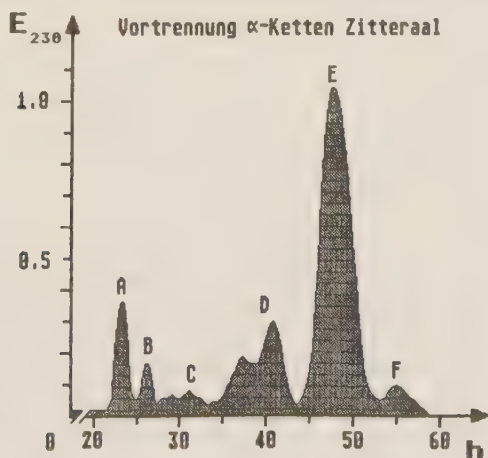
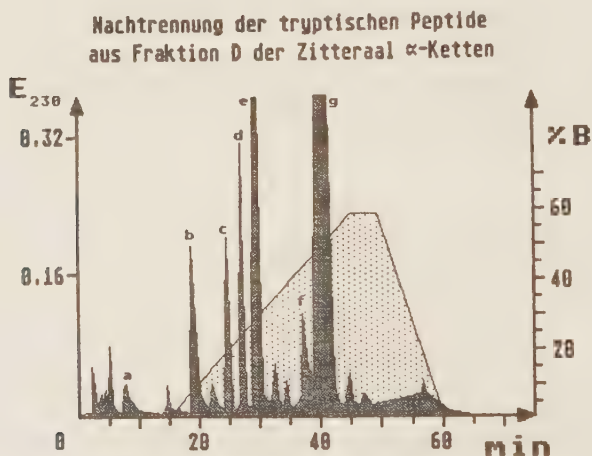


Abb.8

Methode: Gelfiltration
 Säule: Sephadex G-25 fine, 2.6x160 cm
 Puffer: 0.1 M Essigsäure
 Durchfluß: 15 ml/h (5 ml/Fraktion)
 Probe: α -Ketten Zitteraal (nativ, 12 mg)
 Detektion bei 230 nm

A = C-terminales Peptid (ab Pos. FG 5)
 B = Tp 8+9
 C = --
 D = Tp 1a+b, Tp 4b, Tp 5, Tp 6 und Tp 13
 E = Tp 2, Tp 3, Tp 4a und Tp 8
 F = Tp 7, Tp 10 und Tp 14

Abbildung 9: Nachtrennung der Gipfelfraktion IV.

**Abb. 9**

Methode: HPLC
Säule: LiChrosorb RP 2, Fa. Merck, 250x4.6 mm
Puffer A: 0.1% TFA
Puffer B: Acetonitril
Durchfluß: 1 ml/min
Gradient: 15 min isokratisch 0% B
 in 30 min auf 60% B
 5 min isokratisch 60% B
 in 5 min auf 0% B
Detektion bei 230 nm

a = Tp 1a	b = Tp 1a+b
c = Tp 1l	d = Tp 4b
e = Tp 5	f = Tp 13
g = Tp 6	

Diese Methode ist ineffizient: nachteilig sind der große Zeitaufwand und die niedrigen Ausbeuten. Der Bereich der kleineren Peptide (2 - 6 Aminosäuren) erfordert einen zusätzlichen Trennungsschritt (Rechromatographie mittels RP18-Material), was die Ausbeuten nochmals reduziert.

Um die mit dieser Methode nicht isolierten Peptide zu erhalten, wurden Versuche mit Säulen höherer Trennleistung durchgeführt. Als optimal erwies sich eine auf 50°C beheizte Nucleosil--C4-Säule, welche eine Trennung des Gesamthydrolysates ermöglichte.

Abbildung 10: Trennung des tryptischen Gesamthydrolysats.

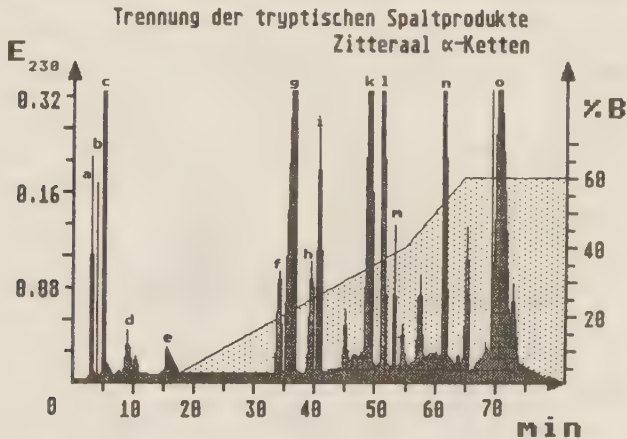


Abb. 10

Methode: HPLC
 Säule: Nucleosil C4, Macherey und Nagel, 250x4,6 mm
 Puffer A: 0,1% TFA
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 0,75 ml/min Temperatur: 50°C
 Probe: Zitteraal α -Ketten (Globin, nativ)
 Gradient: 15 min isokratisch 0% B
 in 40 min auf 40% B
 in 10 min auf 60% B
 Detektion bei 230 nm

a = Tp 7	b = Tp 1b	c = Tp 14 + Tp10
d = Tp 2	e = Tp 1a	f = Tp 11
g = Tp 3	h = Tp 4a	i = Tp 5
k = Tp 6	l = Tp 13	m = Tp 4b
n = Tp 8+9	o = Tp 12+13	

Die Ausbeuten bei dieser Methode lagen zwischen 20 und 60%; dies ist vor allem auf die nicht quantitative tryptische Spaltung zurückzuführen. Eine Verlängerung der Reaktionszeit ergab aber lediglich einen Anstieg an Nebenspaltungsprodukten.

Die Sequenz des blockierten Tp 1 wurde massenspektroskopisch bestimmt (siehe 9.3, ohne Abbildung).

Um die Sequenz des C-terminalen Bereiches abzusichern (Pos. G2-HC3), wurde eine Asp-Pro-Spaltung durchgeführt (siehe 6.2.1), die Trennung der Peptide und die anschließende Entsalzung erfolgten mittels Gelfiltration (siehe 7.1).

Abbildung 11: Asp-Pro-Spaltung Zitteraal α -Ketten.

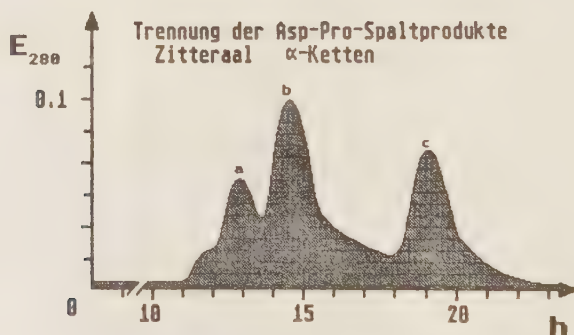


Abb. 11

Methode: Säulenchromatographie
 Säule: Sephadex G-50 fine, 2.6x180 cm
 Puffer: 8 M Harnstoff/10 % Ameisensäure
 Durchfluß: 20 ml/h (5 ml/Fraktion)
 Probe: hydrolyt. Spaltansatz (α -Ketten, 10 mg,
 nativ)

a = ungespaltene Ketten
 b = N-terminales Peptid
 c = Prolylpeptid

Die Ausbeute des Prolylpeptides betrug 20%. Die Verluste erklären sich durch unvollständige Spaltung der säurelabilen Asp-Pro-Bindung, sowie durch Absorptionseffekte bei der Entsalzung.

Zitteraal β -Ketten

Das methodische Vorgehen entsprach dem der α -Ketten: nach der Vortrennung über Sephadex-G-25 und Auftrennung der Peptide mittels HPLC (RP2 und RP18-Material, siehe 7.1 bzw. 7.2) konnten mit Ausnahme des C-terminalen Tp 14 alle Peptide isoliert werden.

Eine Asp-Pro-Spaltung wurde wie unter 6.2.1 beschrieben durchgeführt (ohne Abbildung). Beide so isolierten Peptide wurden tryptisch nachgespalten (siehe 6.1.1) und mittels HPLC getrennt.

Abbildung 12: Trennung des tryptischen Hydrolysats (N-terminales Prolylpeptid).

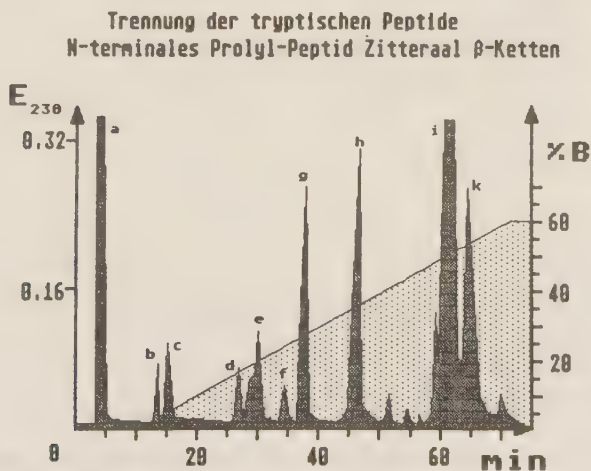


Abb. 12

Methode: HPLC
 Säule: LiChrosorb RP 18, Fa. Merck, 250x4.6 mm
 Puffer A: 0.1% TFA
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1ml/min
 Gradient: 10 min isokratisch 0% B
 in 60 min auf 60% B
 Detektion bei 230 nm

a = Tp 9b	b = Tp 6+7
c = Tp 15(!)	d = Tp 11a
e = Tp 1/Tp 9c	f = Tp 8+9a
g = Tp 6+7/Tp 10	h = Tp 5
i = Tp 4	k = Tp 2+3

Abbildung 13: Trennung des tryptischen Hydrolysats (C-terminales Prolylpeptid).

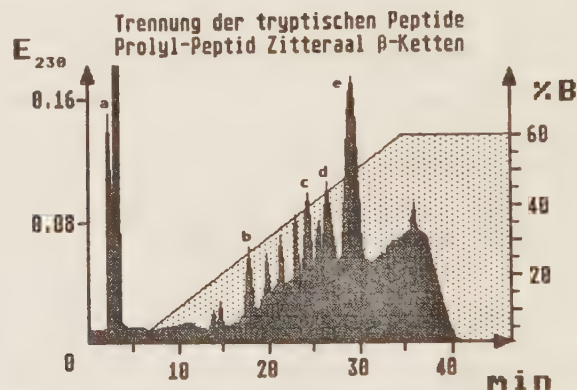


Abb. 13

Methode: HPLC
 Säule: LiChrosorb RP 2, Fa. Merck, 250x4.6 mm
 Puffer A: 0.1% TFA
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min
 Gradient: 5 min isokratisch 0% B
 in 30 min auf 60% B
 Detektion bei 230 nm

a = Tp 15	b = Tp 11b
c = Tp 12a	d = Tp 14
e = Tp 12b+13	

Die Dauer der Asp-Pro-Spaltung wurde auf 48 Stunden begrenzt, um eine Nebenspaltung an der Asn-Pro-Bindung (Position E1,E2) zu vermeiden; die Ausbeute betrug deshalb nur 15 %.

Das fehlende Tp 14 konnte auf diese Weise isoliert werden.

Die Peptide konnten durch Homologie mit der Sequenz der Hämoglobine des Karpfens zugeordnet werden. Die vollständigen Sequenzen der α - und β -Ketten des Zitteraales im Vergleich mit Human sind in Tabelle 1 dargestellt, die Bruttoformeln in Tabelle 3 und 4.

10.3.2 Zitterrochen

Zitterrochen α -Ketten

Die Sequenzen der α -Ketten waren Gegenstand meiner Diplomarbeit. Bis auf zwei Lücken (drei bzw. sieben Aminosäurereste, Pos. E3-E5 bzw. F4-FG1) waren sie bereits bekannt⁽⁴¹⁾; auch hier war festzustellen, daß die Verluste des Trennungsganges Vortrennung - HPLC (RP2) - Rechromatographie (RP18) ein Auffinden der kleinen Peptide erschwerte, zumal es sich um Peptide handelte, deren Eigenschaften (und Lage im Chromatogramm) unbekannt waren.

Um die noch fehlenden Peptide zu erhalten, wurde das tryptische Hydrolysat der oxidierten α -Ketten mit einer RP18-Säule chromatographiert (ohne Abbildung). Die so gefundenen Peptide (Tp 6c und 6d bzw. Tp 9d und 9e) konnten aufgrund ihrer Homologie mit den Hämoglobinen des Dornenhai (*Squalus acanthias*) zugeordnet werden. Eine im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführte Arginylspaltung⁽⁴²⁾ ergab die nötigen Überlappungspeptide.

Zitterrochen β -Ketten

Die Aggregationsneigung der β -Ketten war groß; dies äußerte sich vor allem in der geringen Löslichkeit. Sowohl nativ als auch nach der Oxidation mit Perameisensäure mußte die tryptische Spaltung (siehe 6.1.1) in Suspension vorgenommen werden, wobei stets ein Teil des Kettenmaterials ungespalten zurückblieb. Die Strategie der Sequenzermittlung der β -Ketten des Zitterrochens war wie unter 10.3.1 beschrieben. Mit den üblichen Trennungsmethoden (Vortrennung des tryptischen Gesamthydrolysats und Rechromatographie mittels HPLC, siehe 7.1 und 7.2, ohne Abbildung) waren

auch hier nicht alle Peptide zu isolieren: der gesamte C-terminale Bereich ab Position FG3 fehlte.

Um die beim Ansäuern auftretenden Verluste durch das Ausfällen von Corepeptiden zu vermeiden, wurde das tryptische Gesamthydrolysat bei pH 9.5 mittels einer Nucleosil-C4-Säule getrennt.

Abbildung 14: Trennung des tryptischen Gesamthydrolysats unter alkalischen Bedingungen.

Trennung der tryptischen Peptide Zitterrochen β -Ketten

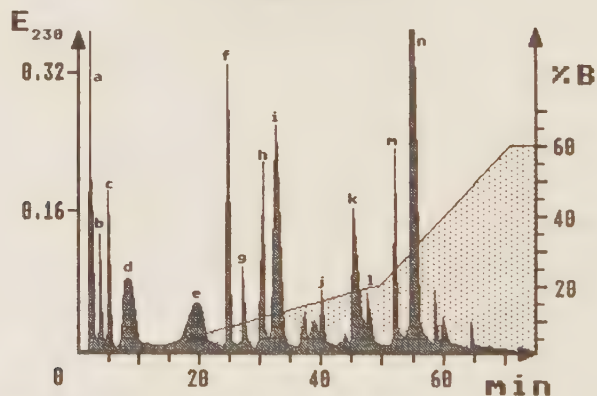


Abb. 14

Methode: HPLC
Säule: Nucleosil C4, Macherey & Nagel, 120x4.5 mm
Puffer A: 0.1% Ammoniak
Puffer B: Acetonitril
Durchfluß: 0.75 ml/min
Gradient: 18 min isokratisch 0% B
in 40 min auf 20% B
in 20 min auf 60% B
5 min isokratisch 60% B
Detektion bei 230 nm

a = Tp 10b	b = Tp 1
c = Tp 5b	d = Tp 6+7+8a
e = Tp 12b+13a+13b	f = Tp 13b
g = Tp 10b+c	h = Tp 9b
i = Tp 1+2+3a	j = Tp 6+7+8+9a
k = Tp 6+7+8+9+10a	l = Tp 11+12a
m = Tp 5a	n = Tp 4

Mit dieser Methode konnten alle Peptide mit Ausnahme des Tp 14+15 isoliert werden, das Tp 11+12 mit einer Ausbeute von 20%.

Um den Bereich der beim Zitterrochen fehlenden D-Loops (Pos. D2-D7) abzusichern, wurde eine Arginylspaltung durchgeführt (siehe 6.2.2). Getrennt wurden die so erhaltenen Peptide mittels Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen (siehe 7.1).

Abbildung 15: Trennung der Arg-Peptide mittels Gelfiltration.

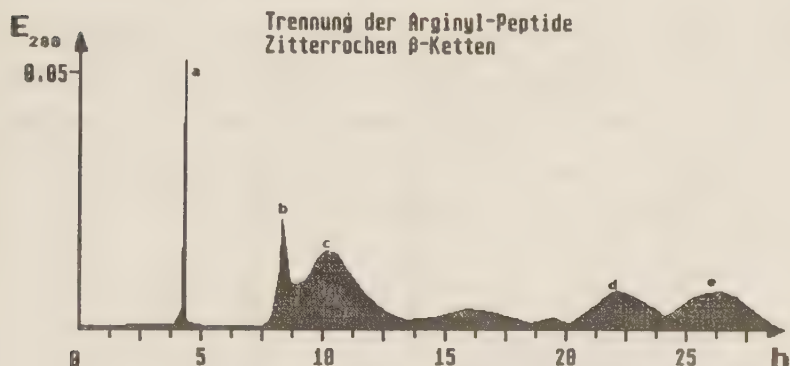


Abb. 15

Methode: Gelfiltration
 Säule: Sephadex G-50 fine, 2.6x180 cm
 Puffer: 0 M Harnstoff/10% Ameisensäure
 Durchfluß: 20 ml/h
 Detektion bei 280 nm

a = Startpeak (Verunreinigungen)
 b = ungespaltenes Kettenmaterial
 c = C-terminales Arginyl-Peptid (ab Position C7)
 d = N-terminales Peptid (bis Position B12)
 e = Tp 4

Die Ausbeuten lagen (nach der Entsalzung) bei 20%. Die Überlappungspeptide mußten nicht nachgereinigt werden.

In Ermangelung der normalerweise invarianten Asp-Pro-Bindungsstelle (Position G1,G2) wurde das C-terminale Arginylpeptid (Pos. C6-HC3) mit der Protease V8 aus *Staphylococcus aureus* nachgespalten (siehe 6.1.2). Die Trennung erfolgte mittels Gel-filtration (siehe 7.1, ohne Abbildung), eine Nachreinigung war erforderlich (HPLC: RP2-Material, 12cm-Säule, siehe 7.2, ohne Abbildung). Die Ausbeuten lagen unter 10%, so daß von den gesuchten Peptiden (ab Pos. GH2) nur einige wenige Aminosäure-reste mittels Gasphasentechnik (siehe 9.2) sequenziert werden konnten. Eine Wiederholung des Versuches ausgehend von nativen β -Ketten scheiterte an der schlechten Löslichkeit des Materiales, sowie an der zu geringen Enzymaktivität.

Eine Tryptophanspaltung wurde durchgeführt (siehe 6.2.3), um das C-terminale Peptid ab Position C4 zu isolieren, welches ähnliche Eigenschaften in Bezug auf die Löslichkeit aufweisen sollte wie das C-terminale Arginylpeptid (ab Position C7). Um die Verluste des Trennungsganges möglichst gering zu halten, wurde abweichend zur etablierten Methode versucht, Entsalzung und Peptidtrennung mittels HPLC in einem Schritt durchzuführen.

Abbildung 16: Trennung der Peptide der Tryptophanspaltung.

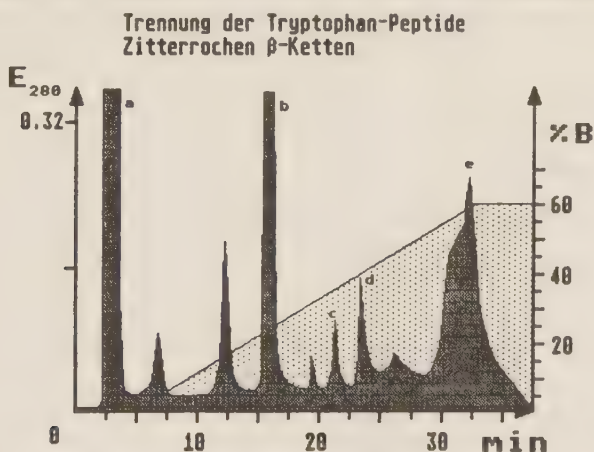


Abb.16

Methode: HPLC
 Säule: LiChrosorb RP 18, Fa. Merck, 250x4.6 mm
 Puffer A: 20%ige Essigsäure
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml/min
 Probe: Zitterrochen β -Ketten
 Gradient: 5 min isokratisch 0% B
 in 30 min auf 60% B
 Detektion bei 280 nm

 a = Startpeak (hauptsächlich Guanidinhydrochlorid)
 b = vermutlich ortho-Iodosobenzoesäure
 c = N-terminales Tryptophanpeptid
 d = Tryptophanpeptid 2 (Pos. 16-37)
 e = C-terminales Peptid (verunreinigt)

Die Ausbeuten des C-terminalen Peptides lagen bei 15%, es war außerdem stark durch ungespaltenes Kettenmaterial verunreinigt, so daß eine Nachspaltung nicht in Frage kam.

Als effektivster Weg zur Isolierung und Sequenzierung der C-terminalen Peptide erwies sich die Bromcyanspaltung des Gesamtglobins (siehe 6.2.4) am einzigen Methionin des Hämoglobins (Pos. $\beta G6$). Da auf den Einsatz der die Kapazität begrenzenden HPLC verzichtet werden konnte, wurde eine entsprechend große Menge des nativen Globins (ca. 150 mg) mit Bromcyan gespalten. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Ansequenzieren des Peptidgemisches überprüft, die Trennung der Peptide erfolgte (unter denaturierenden Bedingungen) ebenso wie die Entsalzung mittels Gelfiltration (siehe 7.1).

Abbildung 17: Trennung der Bromcyan-Peptide.

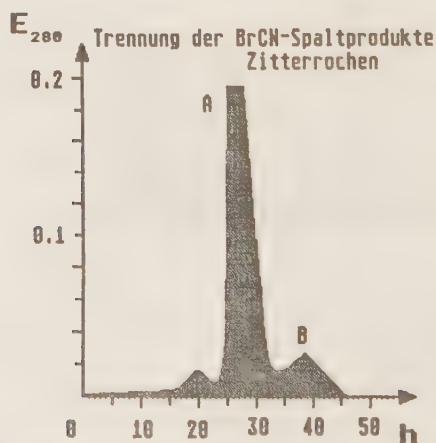


Abb. 17

Methode: Gelchromatographie
 Säule: Sephadex G-50 fine, 2.5x180 cm
 Puffer: 8 M Harnstoff/10 % Ameisensäure
 Durchfluß: 21 ml/h (7 ml/Fraktion)
 Probe: Globin Zitterrochen
 Detektion bei 280 nm

A = Kettenmaterial und N-terminales Peptid
 B = C-terminales Bromcyanpeptid

Die Ausbeute betrug (nach der Entsalzung) 10%. Versuche, die Bromcyanpeptide unter nichtdenaturierenden Bedingungen zu trennen, um die die Ausbeute reduzierende Entsalzung zu umgehen, waren erfolglos: das N- und das C-terminale Peptid bildeten sowohl unter neutralen (0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.8) als auch unter alkalischen Bedingungen (0.1 M Ammoniak) stabile Aggregate und erschienen als eine Gipfelfraktion (ohne Abbildung).

Die Entsalzung des stark hydrophoben C-terminalen Peptides gelang nur in 10%iger Ameisensäure über eine Biogel-P4-Säule; mit 1 M Essigsäure war das Peptid von der Säule nicht zu eluieren.

Das so gewonnene C-terminale Bromcyanpeptid wurde tryptisch nachgespalten und mittels HPLC getrennt. In einem ersten Versuch waren die Ausbeuten (gemessen an der Menge des isolierten Tp 14+15) verschwindend gering (< 5%), da das lyophilisierte Bromcyanpeptid infolge seiner schlechten Löslichkeit von Trypsin nur unvollständig gespalten wurde (ohne Abbildung). In einem zweiten Versuch wurde auf das Lyophilisieren nach der Entsalzung des C-terminalen Bromcyanpeptides verzichtet.

Abbildung 18: Trennung der tryptischen Peptide des C-terminalen Bromcyanpeptids.

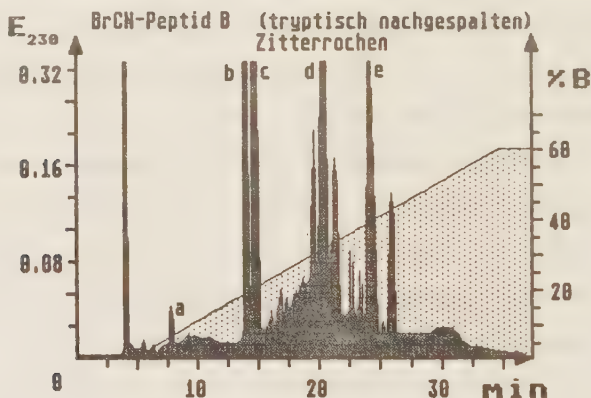


Abb.18

Methode: HPLC
 Säule: Nucleosil C4, Macherey & Nagel, 250x4.6 mm
 Puffer A: 0.1 % TFA
 Puffer B: Acetonitril
 Durchfluß: 0.75 ml/min Temperatur: 50°C
 Probe: BrCN-Peptid B (200 nmol)
 Gradient: 5 min isokratisch
 in 30 min auf 60 % B
 Detektion bei 230 nm

a = Tp 13c
 b = Tp 13b
 c = Tp 13a+b
 d = Tp 14+15
 e = Tp 12

Die Ausbeuten lagen zwischen 50 und 60%. Das bis dahin abgängige Tp 14+15 konnte in reiner Form isoliert werden.

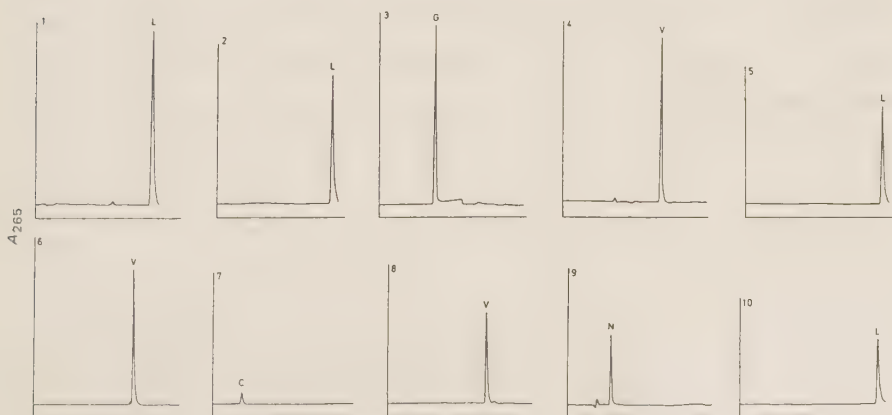
Die Sequenzen der α - und β -Ketten des Zitterrochen sind in Tabelle 2 dargestellt, die Analysen in Tabelle 5 und 6.

11. Gasphasensequenzierung

Für das sehr empfindliche Verfahren des Sequenzierens von Peptiden mit der Gasphasenmethode wurden neue Basen erprobt (siehe 9.2), welche qualitativ und quantitativ dem bis dahin benutzten Trimethylamin ebenbürtig sind.

Der Nachteil des Trimethylamins ist seine große Flüchtigkeit (Sdp.: -3°C); daraus resultiert eine geringe Standfestigkeit des für den Kupplungsschritt nötigen wässrigen Puffers. Im Dauerbetrieb bedeutet dies eine häufige Unterbrechung des Sequenziervorganges; durch das starke Abnehmen der Konzentration des als Base fungierenden Amins ist die Reproduzierbarkeit der Abbau-schritte nicht optimal.

Abbildung 19: HPLC-Identifizierung einer Sequenzanalyse eines tryptischen Peptides.



Die repetitiven Ausbeuten waren denen mit Trimethylamin erzielten vergleichbar. Anfängliche Schwierigkeiten konnten mit der Ermittlung der optimalen Pufferzusammensetzung eliminiert werden: überschreiten die Konzentrationen der vom Trägergas transportierten Amine einen maximalen Wert, so treten vermehrt Thioharnstoffderivate auf, die sich bei der Auswertung der Chromatogramme störend bemerkbar machen. Gute Ergebnisse wurden mit wässrigen Puffern erzielt, welche zwischen 1 und 2 M des jeweiligen Amines enthielten. Um eine hohe Konstanz in der Zusammensetzung des Gasgemisches in der Reaktionskammer zu gewährleisten, wurden die Puffergemische thermostatisiert.

Im Langzeitversuch erwies sich Dimethylallylamin als sehr brauchbar, wogegen Dimethylaminopropin vor allem bei Thermostatisierung zur Zersetzung neigte (schnelle Gelbfärbung der wässrigen Lösung verbunden mit schlechteren Abbauergebnissen); stabilisierend wirkte sich ein Zusatz von Isopropanol aus (ca. 10%).

Die an Stelle des Trimethylamins eingesetzten tertiären Amine sind leichter zu reinigen und besser zu handhaben: bei Erschöpfung des wässrigen Puffergemisches kann das jeweilige Amin einfach in flüssiger Form hinzugefügt werden. Infolge des niedrigeren Dampfdruckes ist auch die Geruchsbelästigung deutlich reduziert.

Die anfänglich käuflich erworbene Trifluoressigsäure konnte durch ein selbst gereinigtes technisches Produkt ersetzt werden. Die Reinigungsprozedur gleicht der Destillation von Essigsäure, wobei zu beachten ist, daß die als Vorlauf auftretenden farbigen (und damit gut detektierbaren) Fluorokomplexe verworfen werden müssen. Die Abbauergebnisse mit der selbst gereinigten Säure sind sehr gut, die Kostenreduzierung ist beträchtlich.

Tabelle 1

Die Sequenzen der α - und β -Ketten des Hämoglobins von Zitteraal
(*Electrophorus electricus*)

1
 HU α Val----- -Ser-Pro-Ala-Asp- -Thr-Asn- -Ala- -Val- -Ala-His- -Gly-Glu-Tyr-
 ZA AcSer-----Leu-Thr-Ala-Lys-Ser-Lys-Ser-Ile-Val-Lys-Ala-Phe-Trp-Gly-Lys-Ile-Gly-Ser-Arg-Ala-Asp-Asp-Ile-
 ZA Val-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Gln-Arg-Gly-Ala-Ile-Val-Asn-Leu-Trp-Gly-His-Leu-----Ser-Pro-Asp-Glu-Ile-
 HU β -His- -Pro-Glu-Glu-Lys-Ser- -Val-Thr-Ala- -Lys-Val-----Asn-Val- -Val-
 10 20
 A B
 C CD
 30 40
 HU α -Leu-Glu- -Phe-Leu-Ser-Phe- -Thr- -Pro-His-Phe-----
 ZA Gly-Ala-Glu-Ala-Phe-Gly-Arg-Met-Leu-Thr-Val-Tyr-Pro-Glu-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Ala-Ser-Trp-Ser-Asp-Leu-
 ZA Gly-Pro-Gln-Ala-Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Tyr-Phe-Ala-Ser-Phe-Gly-Asn-Ile-
 HU β -Gly-Glu- -Gly- -Val- -Phe- -Glu- -Asp-Leu-
 30 40
 C CD
 E
 50 60
 HU α -His----- -Gln- -Gly- -Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-
 ZA Ser-Pro-----Gly-Ser-Ala-Ala-Val-Lys-Lys-His-Gly-Lys-Thr-Ile-Met-Gly-Gly-Ile-Ala-Glu-
 ZA Ser-Ser-Ala-Ala-Ala-Ile-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Ala-Ala-His-Gly-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Ala-Leu-Asp-Lys-
 HU β -Thr-Pro-Asp- -Val- -Lys- -Lys- -Leu- -Phe-Ser-Asp-
 50 60 70
 D E
 EF F FG
 70 80 90
 HU α -Ala- -Val- -Met-Pro-Asn-Ala- -Ser-Ala- -Asp- -His-
 ZA Ala-Val-Gly-His-Ile-Asp-Asp-Leu-Thr-Gly-Gly-Leu-Ala-Ser-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Ala-Phe-Lys-Leu-Arg-Val-
 ZA Ala-Val-Lys-Asn-Leu-Asn-Asn-Ile-Lys-Gly-Thr-Tyr-Ala-Ala-Leu-Ser-Thr-Ile-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-
 HU β Gly-Leu-Ala-His- -Asp- -Leu- -Phe- -Thr- -Glu-Leu- -Cys-Asp-
 80 90
 EF F FG
 G GH
 100 110
 HU α -Val- -Leu- -Ser- -Cys- -Leu- -Thr- -Ala-His-Leu- -Glu-
 ZA Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Ile-Leu-Ala-His-Asn-Leu-Ile-Val-Val-Leu-Ala-Leu-Phe-Pro-Ala-Asp-----Phe-
 ZA Asp-Pro-Asp-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Ala-Glu-Ser-Phe-Thr-Val-Ser-Val-Ala-Met-Lys-Leu-Gly-Pro-Ser-Gly-Phe-
 HU β -Glu- -Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu- -His-His-Phe- -Lys-Glu-----
 100 110 120
 G GH
 H HC
 120 130 140
 HU α -Ala- -Ala-Ser-Leu- -Leu-Ala-Ser- -Ser-Thr-Val- -Thr-Ser-
 ZA Thr-Pro-Glu-Val-His-Met-Ala-Val-Asp-Lys-Phe-Phe-Gln-Asn-Val-Ala-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Arg
 ZA Asn-Ala-Glu-Thr-Gln-His-Ala-Leu-Ala-Lys-Phe-Leu-Ala-Glu-Val-Val-Ser-Ala-Leu-Gly-Lys-Gln-Tyr-His
 HU β Thr-Pro-Pro-Val- -Ala- -Tyr-Gln- -Val-Val- -Gly- -Ala-Asn- -Ala-His-Lys-
 130 140
 H HC

Tabelle 3

Analysen der Peptide der α -Ketten des Hämoglobins von Zitteraal
(*Electrophorus electricus*)

Tp -> Pos.	1a+b 1-7	2 8-11	3 12-16	4a 17-20	4b 21-31	5 32-40	6 41-57	7 58	8 59-61
Asx	--	--	--	--	2.09	--	1.11	--	--
Ihr	0.92	--	--	--	--	1.84	1.02	--	--
Ser	1.90	1.18	--	1.08	--	--	4.01	--	--
Glx	--	--	--	--	1.05	1.07	--	--	--
Pro	--	--	--	--	--	0.96	1.06	--	--
Gly	--	--	1.05	1.08	1.98	--	1.11	--	1.07
Ala	1.11	--	1.26	--	2.97	--	3.01	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	--	0.78	--	--	--	1.03	0.80	--	--
Met	--	--	--	--	--	0.86	--	--	--
Ile	--	0.79	--	0.89	0.93	--	--	--	--
Leu	1.09	--	--	--	--	1.07	0.96	--	--
Tyr	--	--	--	--	--	0.90	1.07	--	--
Phe	--	--	0.86	--	1.02	--	0.94	--	--
Trp	--	--	(1)	--	--	--	(1)	--	--
His	--	--	--	--	--	--	--	--	0.95
Lys	1.98	1.21	0.83	--	--	1.07	0.96	1.00	0.97
Arg	--	--	--	0.95	0.96	--	--	--	--
Summe	7	4	5	4	11	9	17	1	3

Tp -> Pos.	9 62-91	10 91-93	11 94-100	13 129-140	14 141-142	Pro-Peptid 96-142	Bruttoformel 1-142
Asx	2.16	--	1.89	1.09	--	4.70	12.87 (11)
Ihr	1.86	--	--	--	--	1.91	7.26 (7)
Ser	2.19	--	--	1.27(2)	--	2.37	9.95 (12)
Glx	2.09	--	--	2.14	--	2.82	9.87 (7)
Pro	--	--	0.95	--	--	3.18	5.83 (6)
Gly	4.72	--	--	--	--	2.25	9.97 (11)
Ala	3.93	--	1.22	1.92	--	7.07	18.36 (19)
Cys	--	--	--	--	--	--	-- (8)
Val	1.15	--	0.99	1.01	--	3.47	9.25 (10)
Met	0.93	--	--	--	--	0.91	3 (3)
Ile	2.78	--	--	--	--	1.51	6.19 (8)
Leu	4.26	1.04	--	1.13	--	4.44	12.52 (13)
Tyr	--	--	--	--	0.97	0.38	2.85 (3)
Phe	0.98	--	0.89	2.31	--	4.37	9.09 (9)
Trp	--	--	--	--	--	--	2 (2)
His	1.83	--	--	--	--	2.57	6.17 (5)
Lys	1.12	0.96	1.07	1.11	--	3.76	12.31 (12)
Arg	--	--	--	--	1.03	1.29	4.51 (4)
Summe	30	2	7	12	2	47	142

Tabelle 4

Analysen der Peptide der β -Ketten des Hämoglobins von Zitteraal
(*Electrophorus electricus*)

Typ -> Pos.	1 1-8	2+3 9-30	4 31-40	5 41-59	6+7 60-65	8+9a 66-73	9b 74-77	9c 78-82
Asx	--	2.11	--	1.96	--	1.07	--	2.88
Ihr	0.89	--	0.85	--	--	--	--	--
Ser	--	0.92	--	2.87	--	--	--	--
Glx	2.93	1.97	1.05	--	--	--	--	--
Pro	--	1.89	1.07	1.06	--	--	--	--
Gly	--	3.09	--	2.26	1.01	1.08	--	--
Ala	1.12	3.06	--	4.12	1.98	1.12	1.06	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.92	0.93	0.93	--	0.96	2.70	0.97	--
Met	--	--	--	0.98	--	--	--	--
Ile	--	1.87	0.91	1.84	--	--	--	0.92
Leu	1.11	3.12	2.19	--	--	1.10	--	1.13
Tyr	--	--	0.87	0.75	--	--	--	--
Phe	--	--	--	2.15	--	--	--	--
Trp	--	(1)	(1)	--	--	--	--	--
His	--	1.02	--	--	1.00	--	--	--
Lys	--	--	--	1.09	1.05	0.93	0.97	1.07
Arg	1.03	1.02	1.13	--	--	--	--	--
Summe	8	22	10	19	6	8	3	6

Typ -> Pos.	10 83-95	11 96-104	12a 105-117	12b+13 118-133	14 134-144	15 145-147	Bruttoformel 1-147
Asx	--	3.00	--	1.18	--	--	12.20 (12)
Ihr	1.74	--	1.04	0.85	--	--	5.37 (6)
Ser	2.05	--	1.95	1.05	1.08	--	9.92 (10)
Glx	1.28	--	0.87	1.81	0.90	1.01	11.82 (12)
Pro	--	1.02	--	1.14	--	--	6.18 (6)
Gly	1.05	--	--	2.08	1.03	--	11.60 (11)
Ala	2.10	--	1.87	2.80	2.27	--	21.50 (21)
Cys	--	--	--	--	--	--	-- (0)
Val	--	0.93	1.92	--	1.81	--	12.07 (13)
Met	--	--	0.90	--	--	--	1.80 (2)
Ile	0.75	--	--	--	--	--	6.29 (7)
Leu	0.92	0.98	2.02	1.73	1.87	--	16.17 (16)
Tyr	0.70	--	--	--	--	0.84	3.16 (4)
Phe	--	1.05	1.18	1.07	0.94	--	6.39 (6)
Trp	--	--	--	--	--	--	2 (2)
His	1.17	1.04	--	1.10	--	1.15	6.48 (6)
Lys	1.23	--	1.25	1.19	1.10	--	9.88 (9)
Arg	--	0.99	--	--	--	--	4.17 (4)
Summe	13	9	13	16	11	3	147

Tabelle 5

Analysen der Peptide der α -Ketten der Hämoglobine von Zitterrochen (*Torpedo marmorata*)

Tp -> Pos.	1+2a 1-8	2b 9-11	3 12-16	4 17-31	5 32-40	6a 41-45	6b 46-53	6c 54	6d 55-56	7+8+9a 57-64	9b+c 65-82
Asx	0.85	--	1.03	--	--	--	2.05	--	--	0.95/0	4.92
Thr	--	--	--	0.92	0.95	--	--	--	--	--	1.05
Ser	0.86	--	--	0.83	--	0.95	1.83	--	--	--	--
Glx	1.17	--	0.91	2.95	1.98	--	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	--	0.96	0.99	--	--	--	--	1.11
Gly	1.03	--	--	1.06	--	--	1.01	--	--	0.98	--
Ala	--	1.05	--	2.94	--	--	1.00	--	--	0/0.95	1.06
Cys	--	--	--	--	0.90	--	--	--	--	--	--
Val	0.92	--	--	0.98	--	--	--	--	0.96	1.04	1.05
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	0.87	--	0.83	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.15	--	2.10	2.45	1.20	--	--	--	--	2.08	3.97
Tyr	--	--	--	--	--	0.86	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	0.95	1.18	1.97	--	--	--	--
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
His	--	--	--	1.03	0.98	--	--	--	--	1.94	3.84
Lys	2.02	1.08	0.96	--	1.00	1.02	1.14	--	1.04	1.01	1.00
Arg	--	--	--	1.01	--	--	--	1.00	--	--	--
Summe	8	3	5	15	9	5	9	1	2	8	18

Tp -> Pos.	9c 72-82	9d 83-86	9e 87-89	9f+10+11 90-99	12 100-127	13+14 128-141	Bruttoformel 1-141
Asx	2.81	--	--	1.95/2.95	2.13	--	14.09 (14)
Thr	--	--	--	--	2.02	0.93	5.66 (6)
Ser	--	--	--	--	2.01	1.80	7.78 (8)
Glx	--	0.95	--	--	3.07	2.95	14.69 (14)
Pro	0.97	--	--	0.99	1.07	--	4.67 (5)
Gly	--	--	1.07	0.99/--	--	--	5.21 (5/6)
Ala	--	1.03	--	--	3.87	--	13.12 (11)
Cys	--	--	--	--	1.95	--	1.84 (3)
Val	--	--	--	1.00	2.07	1.13	8.55 (9)
Met	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	1.13	--	3.10 (3/4)
Leu	3.36	1.05	--	2.05	3.03	3.24	21.31 (21)
Tyr	--	--	--	--	--	1.90	2.84 (3)
Phe	--	--	--	1.02	1.85	1.09	8.26 (8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--
His	2.88	--	0.84	1.01	1.85	--	12.34 (12)
Lys	0.98	0.97	1.09	0.98	0.95	--	14.75 (15)
Arg	--	--	--	--	--	0.96	2.83 (3)
Summe	11	4	3	10	27	14	141

Tabelle 6

Analysen der Peptide der β -Ketten der Hämoglobine von Zitterrochen (*Torpedo marmorata*)

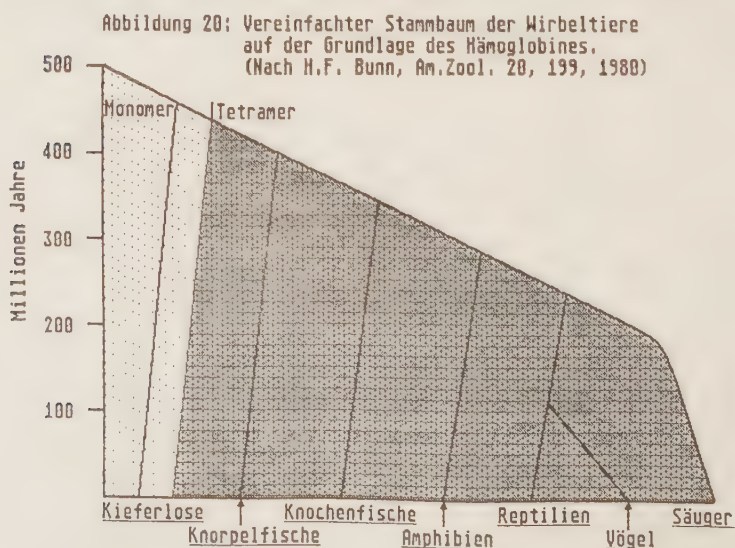
TP -> Pos.	1 1-8	2+3a 9-26	3b 27-30	4 31-40	5a 41-50	5b 51-58	5c+6+7+8+9a 59-69	9b+10a 70-83
Asx	1.07	2.15	--	--	2.03	1.12	2.12	2.93
Ihr	0.89	0.92	--	1.89	0.92	--	--	--
Ser	1.05	1.07	--	--	0.97	0.88	0.84	0.91
Glx	1.90	1.85	1.07	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.09	--	--	--	--
Gly	--	--	--	--	--	--	1.06	1.12
Ala	--	1.13	0.95	--	--	0.84	1.09	3.08
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.02	2.79	--	2.08	--	--	2.89	1.00
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	2.88	--	--	--	--	--	0.89
Leu	1.12	1.16	1.03	--	1.25	--	--	2.03
Tyr	--	--	--	1.76	--	--	--	--
Phe	--	--	--	1.13	2.83	--	--	--
Trp	--	(1)	--	(1)	--	--	--	--
His	--	1.91	--	--	0.89	--	0.92	1.02
Lys	0.95	1.14	--	--	1.11	1.16	1.09	1.02
Arg	--	--	0.95	1.05	--	--	--	--
Summe	8	18	4	10	10	4	11	14

TP -> Pos.	10b 84-91	10c+d 92-95	11+12a 96-119	12b+13a+13b 120-128	13c 129-132	14+15 133-146	Bruttoformel 1-146
Asx	1.04	--	2.10	1.16	--	--	15.72 (15)
Ihr	0.86	--	1.07	1.10	--	0.98	8.63 (9)
Ser	1.96	--	1.15	--	--	0.90	9.73 (10)
Glx	--	0.98	3.11	1.07	--	3.29	13.27 (13)
Pro	--	--	--	0.99	--	--	2.08 (2)
Gly	--	--	2.08	--	--	--	4.26 (4)
Ala	1.10	--	2.96	--	1.93	1.12	14.20 (14)
Cys	--	--	--	--	--	0.90	0.90 (1)
Val	--	--	1.87	--	--	1.84	13.49 (14)
Met	--	--	0.80	--	--	--	0.80 (1)
Ile	--	--	--	--	--	--	3.77 (4)
Leu	1.04	--	4.97	--	1.00	2.03	15.63 (15)
Tyr	--	--	--	0.56	--	0.79	3.08 (4)
Phe	0.98	--	2.78	1.01	--	1.05	9.78 (10)
Trp	--	--	--	--	--	--	2 (2)
His	--	0.95	--	1.05	--	1.15	8.89 (9)
Lys	1.02	2.07	1.11	2.06	1.07	--	13.80 (13)
Arg	--	--	--	--	--	--	2.00 (2)
Summe	8	4	24	9	4	14	142

Diskussion

Eine der Grundvoraussetzungen für alle Lebewesen ist die ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Ab einer bestimmten Größe des Organismus reicht die allein durch Diffusion gelieferte Sauerstoffmenge nicht mehr aus, um die Stoffwechselvorgänge zu unterhalten. Die Natur sah sich gezwungen, leistungsfähige Moleküle mit Vehikelfunktion zu entwickeln, welche die reaktiven Sauerstoffmoleküle reversibel vom Ort der Aufnahme (Kiemen, Lunge) zum Ort des Verbrauches (Mitochondrien) bringen. Umgekehrt muß dieses Transportmolekül in der Lage sein, die anfallenden Stoffwechselprodukte (Kohlendioxid) ebenfalls reversibel zu binden und zu entfernen. Als diesen Anforderungen entsprechend erwiesen sich Proteide, welche als Ort der Sauerstoffbindung stets ein Übergangsmetall (Kupfer oder Eisen) besitzen.

Alle Vertebraten verwenden zum Transport und zur Speicherung von Sauerstoff Hämoglobin und Myoglobin; lediglich die primitivsten Vertreter dieses Stammes, die Kieferlosen (Agnathi), besitzen nur das monomere Myoglobin⁽³⁵⁾.



Mit der Höherentwicklung der Arten wurden die Anforderungen an die Atmungsenzyme immer größer; es erwies sich als besonders vorteilhaft, Regulationsmechanismen zu entwickeln, mit deren Hilfe die Sauerstoffaffinität gesteuert werden kann. Dies wird erreicht durch homotrope und heterotrope Wechselwirkungen im tetrameren Hämoglobin.

Die homotrope Wechselwirkung wird auch als Kooperativität bezeichnet: sie kommt zustande, wenn ein entsprechender Ligand (z.B. ein O_2 -Molekül) am aktiven Zentrum angelagert wird, wobei sich die Affinitäten der verbleibenden aktiven Zentren des Hämoglobins verändern. Als Maß für die Größe der Kooperativität dient die Steigung der Tangente im Wendepunkt der Sauerstoffbeladungskurve; sie wird als Hill-Koeffizient definiert und liegt für die meisten Vertebraten zwischen 2.5 und 3. Erstaunlich ist die Tatsache, daß auch im monomeren Hämoglobin der Neunaugen (*Lampetra*, Klasse Agnatha) schon eine, wenn auch nur leichte, Kooperativität gefunden wurde⁽³⁶⁾. Dies setzt die Existenz zweier Konfigurationsisomeren mit unterschiedlicher Sauerstoffaffinität voraus⁽³⁷⁾, wobei die Deoxyform sich durch Bildung von Aggregaten stabilisieren kann⁽³⁸⁾.

Ein Vergleich der Tertiärstrukturen vom Hämoglobin des Neunauges⁽³⁹⁾ mit Myoglobin des Menschen ergibt einen hohen Grad an Übereinstimmung, trotz der geringen Ähnlichkeit in Bezug auf die Primärstruktur⁽⁴⁰⁾.

Dies legt den Schluß nahe, daß eine einmal optimierte Tertiärstruktur über Millionen von Jahren (und den damit verbundenen Mutationen) beibehalten wird und einen Vergleich der Primärstrukturen erst sinnvoll erscheinen läßt.

Die heterotropen Wechselwirkungen entstehen durch den Einfluß verschiedener allosterischer Effektoren (z.B. H^+ , organische Phosphate), d.h. kleine Moleküle verändern durch ihre Bindung fern des aktiven Zentrums dessen Reaktivität und damit Affinität. Bei höherentwickelten Lebewesen werden diese Effektoren dazu verwendet, die Sauerstoffabgabe in der Zelle zu erleichtern.

Physiologie und Morphologie

Zitterrochen (*Torpedo marmorata*) und Zitteraal (*Electrophorus electricus*) gehören der Klasse der Knorpel- (*Chondrichthyes*) bzw. Knochenfische (*Osteichthyes*) an und wurden auf Grund ihrer Besonderheiten ausgewählt: der entwicklungsgeschichtlich sehr alte Zitterrochen ist ein Bewohner des Meeresbodens; er lebt in Tiefen zwischen 5 und 100 m und ist weltweit verbreitet (in Europa hauptsächlich im Mittelmeer und Westatlantik). Er benützt seine elektrischen Organe zur Orientierung und zur Jagd; bevorzugte Beute sind kleinere Fische und Krebse. Er erreicht eine maximale Körperlänge von 60 cm und ist ovovivipar⁽⁴¹⁾. Wie alle Knorpelfische besitzt der Zitterrochen keine Schwimmblase, welche eine Horizontalbewegung im Wasser ungemein erleichtern würde (Evolutionsvorteil der Knochenfische!)(⁴²). Stattdessen entwickelten alle Knorpelfische eine optimale hydrodynamische Gestalt (Haie und Rochen!).

Eine Besonderheit der bodenbewohnenden Rochen besteht darin, daß sie nicht wie die meisten anderen Fische Wasser durch das Maul aufnehmen, sondern durch die auf der Oberseite gelegenen Spritzlöcher; damit wird eine Beeinträchtigung der Atmung durch Schlamm und Mulm vermieden⁽⁴³⁾.

Das Blut des Zitterrochen zeigt keine heterotropen Wechselwirkungen und nur eine niedrige Kooperativität (Hill-Koeffizient ca. 1.5)(^{44,45}).

Der zur Ordnung der Karpfenfische (*Cyprinoformes*) gehörende Zitteraal kommt ausschließlich im flachen Süßwasser Südamerikas vor (Hauptverbreitungsgebiet: Amazonas und Orinoco). Auch er ernährt sich von kleineren Fischen und Amphibien, die er unter Zuhilfenahme seiner elektrischen Organe erlegt. Sämtliche übrigen Organe nehmen nur das vorderste Viertel der Gesamtlänge des Fisches (bis 1.5 m) ein⁽⁴⁶⁾. Die Kiemen sind im adulten Stadium verkümmert, die Sauerstoffversorgung erfolgt durch Luftschnappen an der Wasseroberfläche. Im Maul des Zitteraales befindet sich ein besonderes Gefäßsystem, welches ihm erlaubt, den Sauerstoff direkt aus der Luft zu entnehmen. Zu diesem Zweck muß er allerdings alle 2 Minuten auftauchen; wird dies verhindert, erstickt der Fisch. Hält man dagegen den Körper und das Maulinnere feucht, ist er sehr leicht zu halten (dies macht ihn zu einem bevorzugten Objekt für neurologische, physiologische und elektrobiologische Untersuchungen)⁽⁴⁷⁾.

Interessant ist, daß beim Zitteraal (wie bei vielen Amphibien und Reptilien) arterieller und venöser Kreislauf nicht vollständig getrennt sind: bevor das sauerstoffgesättigte arterielle Blut in das Gewebe gepumpt wird, wird es mit venösem Blut gemischt, so daß es nur zu ca. 50% mit Sauerstoff beladen ist⁽⁴⁸⁾. Anscheinend ist die Sauerstoffbeladung bei den luftatmenden Fischen so vollständig, daß die Durchmischung von arteriellem mit venösem Blut keinen Nachteil darstellt.

Demgegenüber sehen sich alle kiemenatmenden Fische der weitaus geringeren Sauerstoffkonzentration in Wasser ausgesetzt (ca. 0.6 Vol. %!), welche ausserdem sehr starken Schwankungen unterworfen sein kann (abhängig von Temperatur, Gehalt an Mikroorganismen etc.)⁽⁴⁹⁾.

Es erscheint als zwingende Notwendigkeit, daß unter Wasser atmende Fische neben einem getrennten Kreislauf stets eine größere Affinität der Hämoglobine zu Sauerstoff zeigen als Luftatmende.

Wie fast alle Knochenfische verfügt der Zitteraal über eine Schwimmblase, zeigt aber keinen Root-Effekt; die sonstigen heterotropen Wechselwirkungen entsprechen denen der bisher untersuchten Knochenfische⁽⁵⁰⁾.

Der Root-Effekt

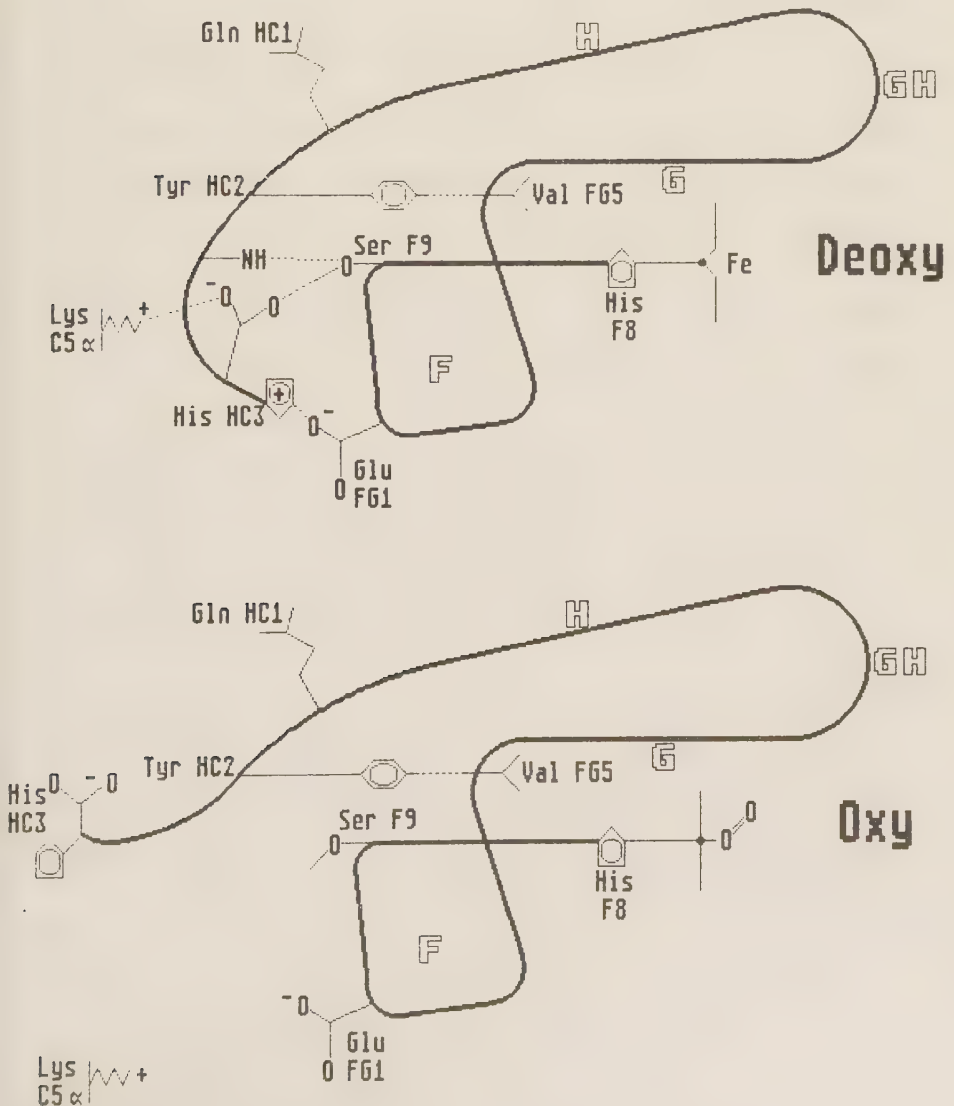
Die Hämoglobine der meisten Knochenfische zeigen den nach seinem Entdecker benannten Effekt⁽⁵¹⁾. Darunter versteht man die drastische Abnahme der Sauerstoffkapazität des Blutes bei fallenden pH-Werten.

Eine Erklärungsmöglichkeit sieht so aus: das tetramere Hämoglobinmolekül kommt in zwei Konformationen vor (Tense- und Relaxed-Form), welche miteinander im Gleichgewicht stehen. Die T-Form zeigt nur geringe Affinität zu Sauerstoff, die R-Form große. Die Einstellung des Gleichgewichtes ist jedoch beeinflussbar von Liganden (z.B. Protonen)⁽⁵²⁾. Während der Übergang von der T- zur R-Form (und damit Deoxy- zur Oxyform) bei normalem pH leicht vonstatten geht, bewirkt ein Anstieg der H^+ -Ionenkonzentration eine Stabilisierung der T-Form, so daß das Gleichgewicht Deoxy- $\leftrightarrow$ Oxy-Form weit auf die Seite der Edukte verschoben wird. Die Stabilisierung der Deoxyform geht soweit, daß selbst mit Drucken von 400 Atmosphären reinem Sauerstoff keine Sättigung der Hämoglobine erzielt werden kann⁽⁵³⁾.

An den Hämoglobinen eines typischen Knochenfisches, des Karpfen, wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾, welche zu folgender Modellvorstellung führten⁽³⁸⁾:

Dargestellt ist der C-terminale Bereich der β -Ketten der Hämoglobine des Karpfens.

Abbildung 21: Molekulare Ursachen des Root-Effektes beim Karpfen (nach M.F. Perutz, Mol.Biol.Evol., 1983)



Der Schluß, daß der Root-Effekt hauptsächlich durch das Zustandekommen der Salzbrücke zwischen Ser F9 β und His HC3 β hervorgerufen wird, wurde nach der enzymatischen Abspaltung des C-terminalen His gezogen⁽⁵⁷⁾. Untersuchungen an den Hämoglobinen der Forelle ergaben, daß die keinen Root-Effekt zeigende Hb-Komponente I weder Ser F9 β noch His HC3 β enthält^(58,59). Es gibt bis heute kein Root-Effekt aufweisendes Hämoglobin, welches in Position β F9 kein Ser hat⁽⁶⁰⁾. Umgekehrt sind mittlerweile einige Primärstrukturen bekannt, welche trotz der als notwendig erachteten Aminosäuren keinerlei Root-Effekt zeigen: so zum Beispiel der Lungenfisch⁽⁶¹⁾, einige Amphibien und der Zitteraal. Wie es scheint, geriet bei Lebewesen, die den Root-Effekt nicht benötigen (Flachwasserbewohner!), derselbe im Zuge der Evolution wieder in Vergessenheit. Einen anderen Weg beschritten auf schnelle Bewegungen angewiesene Knochenfische, wie der Thunfisch⁽⁶²⁾ oder die Makrele: ihr Blut weist einen normalen Root-Effekt auf, aber die Schwimmblase ist in adulten Tieren nur noch rudimentär vorhanden⁽⁶³⁾. Damit vermeiden sie die Nachteile dieses die vertikale Fortbewegung behindernden Organes und wahren den Vorteil der Sauerstoffsezernierung bei niedrigen pH-Werten.

Der gentechnologische Einbau von Ser F9 β in Humanhämoglobin ergab, daß diese Mutation allein nicht ausreichend ist, um den Root-Effekt zu verursachen⁽⁶⁴⁾. Es scheint sich vielmehr um ein Zusammenwirken mehrerer in Schlüsselpositionen sitzender Aminosäuren zu handeln.

Der Bohr-Effekt

Der Bohr-Effekt wurde erstmals im Jahre 1904 beschrieben: man stellte fest, daß die Sauerstoffbeladung einer Hämoglobinlösung abhängig ist von der Konzentration an Kohlendioxid⁽⁶⁵⁾. Spätere Untersuchungen ergaben, daß als eigentlicher Effektor die Protonenkonzentration anzusehen ist⁽⁶⁶⁾.

Bei pH-Werten zwischen 9 und 6 nimmt die Sauerstoffaffinität mit zunehmender Protonenkonzentration ab (Bohr-Effekt), umgekehrt erhöht sich bei Sauerstoffabgabe die Protonenaffinität (Haldane-Effekt); beide Effekte sind äquivalent und werden als alkalischer Bohr-Effekt bezeichnet. Bei pH-Werten unter 6 bewirkt ein weiterer Anstieg der H^+ -Ionenkonzentration dagegen ein Ansteigen der Sauerstoffaffinität (saurer oder reverser Bohr-Effekt)⁽⁶⁷⁾.

Vereinfacht läßt sich der Bohr-Effekt so beschreiben:

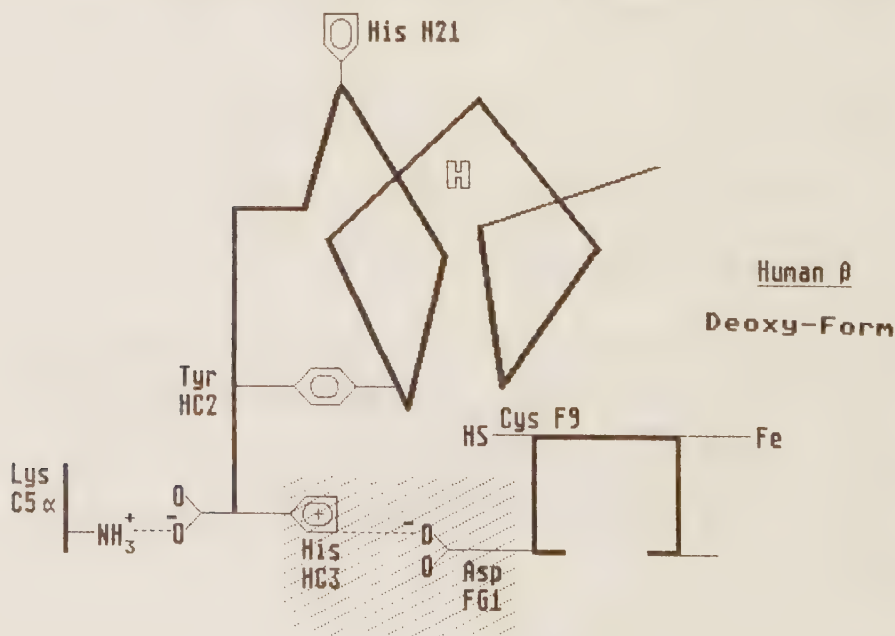


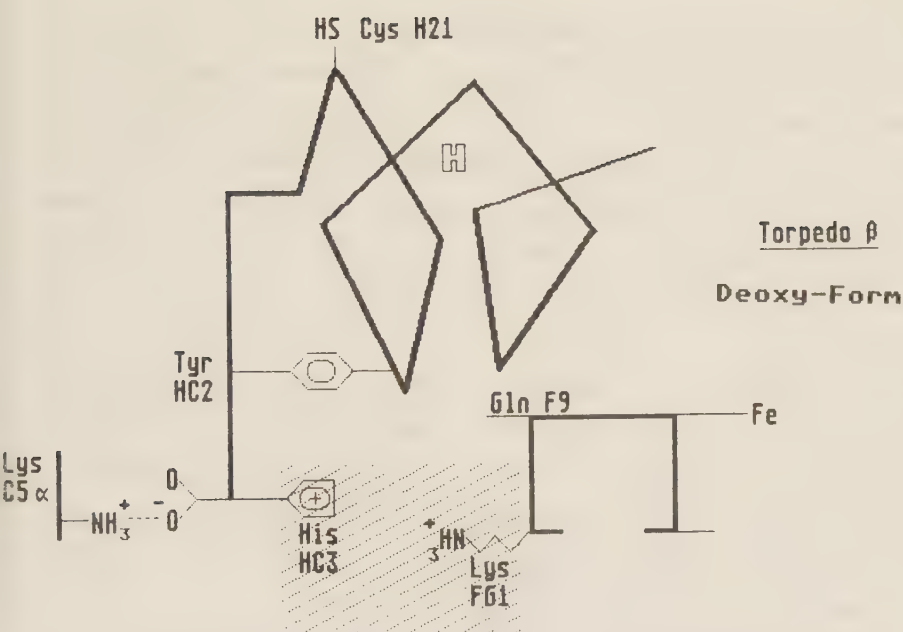
Durch die Sauerstoffabgabe werden also Protonen aufgenommen, was gleichzeitig die Konzentration an leicht löslichem Hydrogencarbonat erhöht; dies vereinfacht den Abtransport an Kohlendioxid erheblich: 90% des entstehenden Kohlendioxides können als Bicarbonat transportiert werden, 10% werden als Carbamylat entfernt.

Der alkalische Bohr-Effekt erhöht die Leistungsfähigkeit des Hämoglobinmoleküles beträchtlich; fast alle Vertebraten bedienen sich dieser wirkungsvollen Regulationsmöglichkeit. Eine Ausnahme bilden die Knorpelfische, einige Amphibien, die Hämoglobinkomponente Hb I der Forelle⁽⁶⁸⁾ und das abnormale Hämoglobin Hiroshima (His HC3 β --> Asp)⁽⁶⁹⁾.

Aufgrund röntgenstrukturanalytischer Untersuchungen am Hämoglobin des Menschen läßt sich die Stabilisierung der Deoxy-Formen mittels Protonen so darstellen (die entscheidende Salzbrücke ist schraffiert):

Abbildung 22: Struktur des C-terminalen Bereiches der β -Untereinheiten (nach M.F. Perutz, Nature New Biology, 232, No. 31, 147 ff)





Wie man sieht, sind im Hämoglobin des Zitterrochens die entscheidenden Aminosäuren ausgetauscht, wodurch sich das Fehlen des Bohr-Effektes gut verstehen läßt.

Im Hämoglobin des Zitterraales, der einen normalen Bohr-Effekt aufweist⁽⁵⁰⁾, befindet sich in Position FG1 β ein Glu; eine Salzbrücke mit His HC3 β kann so gebildet werden.

Die Hämtasche

Röntgenstrukturuntersuchungen an entwicklungsgeschichtlich sehr weit entfernten Proteinen ergaben, daß sich die Umgebung eines einmal entwickelten reaktiven Zentrums nicht oder nur sehr wenig ändert⁽⁷⁰⁾, wenn die Funktionsfähigkeit nicht eingebüßt werden soll. Lesk und Chothia untersuchten zu diesem Zweck die Struktur der Hämoglobine von Pferd und einer Pflanze (Leghämoglobin der Lupine).

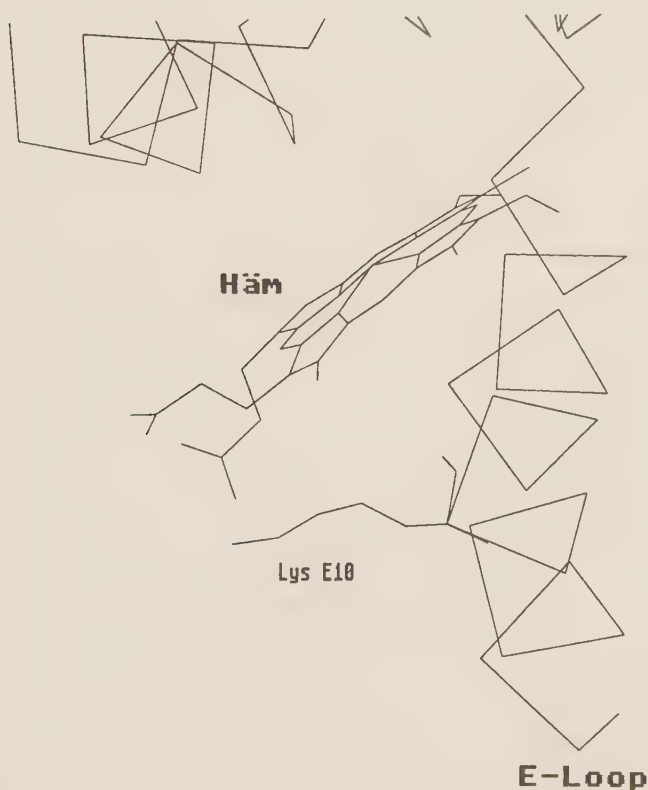
Sie stellten fest, daß sich die Lage der Helices, welche um den Porphyrin-Ring des Häms gruppiert sind, nur sehr geringfügig unterscheidet. Dies läßt einen Vergleich der Aminosäuresubstitutionen im Bereich der Hämtasche von menschlichem Deoxyhämoglobin mit den von mir erarbeiteten Sequenzen als sinnvoll erscheinen.

Tabelle 9: Ausgetauschte Hämbindungsstellen im Hämoglobin von Mensch im Vergleich mit Zitteraal und Zitterrochen (nach Fermi G., Perutz M.F., Atlas of Molecular Structures in Biology, 1981).

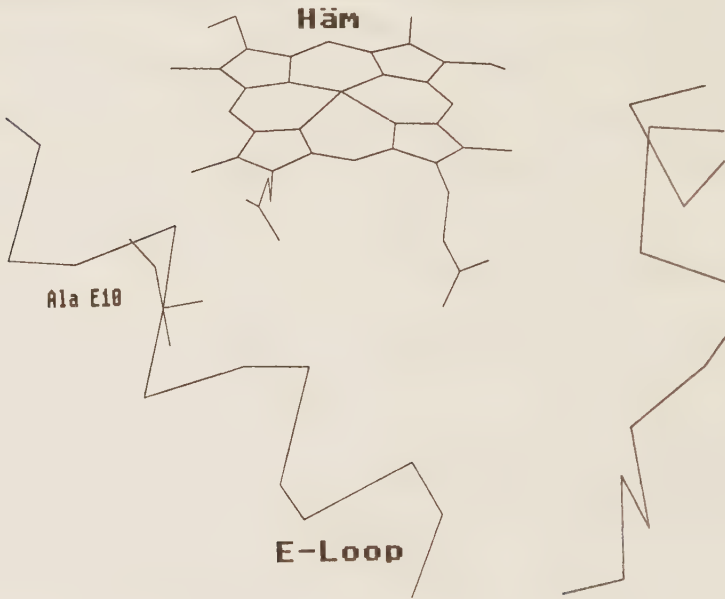
Position	α -Ketten			β -Ketten		
	Human	Zitteraal	Zitterrochen	Human	Zitteraal	Zitterrochen
C 7				Phe	Tyr	Leu
CD 3	His	Ser	Lys			
CD 4	Phe	Trp				
E 10	Lys		Ala/Asp	Lys	Val	Asn
E 14	Ala	Gly				
E 15	Leu	Ile		Phe	Leu	Leu
F 1				Phe	Tyr	
F 7	Leu		Lys	Leu	Ile	Lys
G 8	Leu		Phe			

Die gravierendsten Austausche wurden mit einem Computerprogramm (FRODO) berechnet und dargestellt⁽⁷¹⁻⁷³⁾: die Koordinaten (Version 1ABC, Stand Juli 1987) von Deoxyhämoglobin des Menschen⁽⁷⁴⁾ wurden von der Protein-Daten-Bank (Brookhaven National Laboratory) übernommen. Die Auflösung beträgt 0.174 nm.

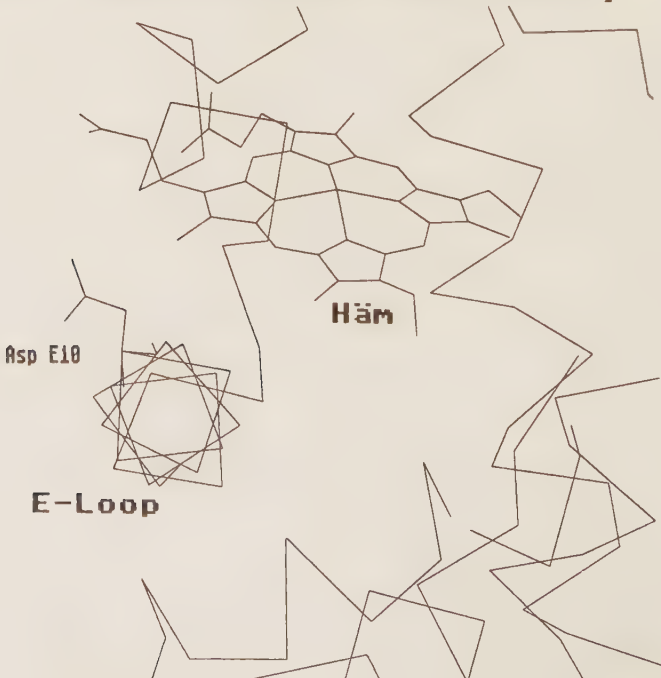
Nummer 1: Hämtasche Mensch Position α E10 Lys



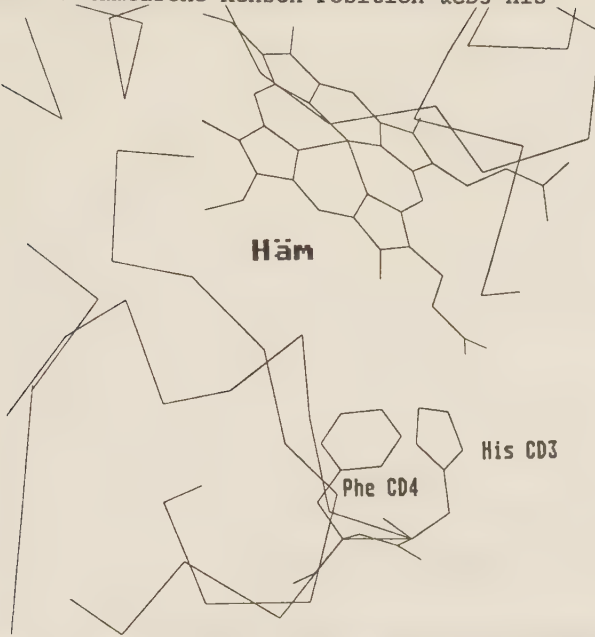
Nummer 2: Hämtasche Zitterrochen Position α E10 Ala



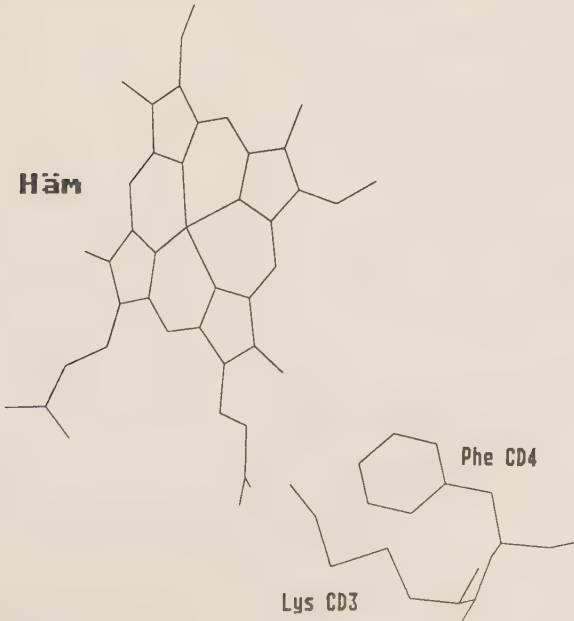
Nummer 3: Hämtasche Zitterrochen Position α E10 Asp

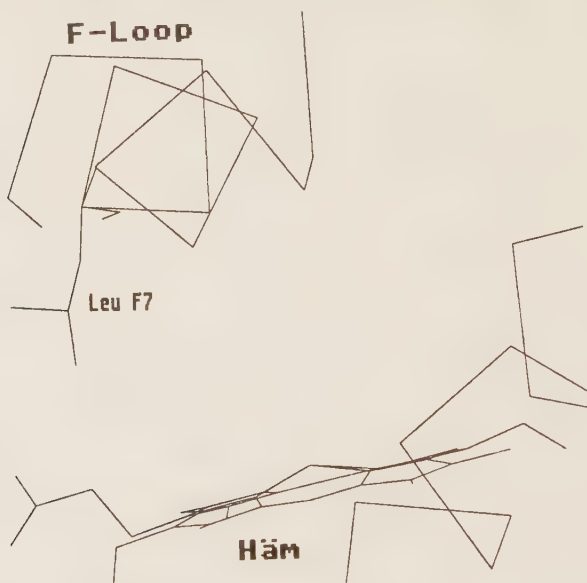
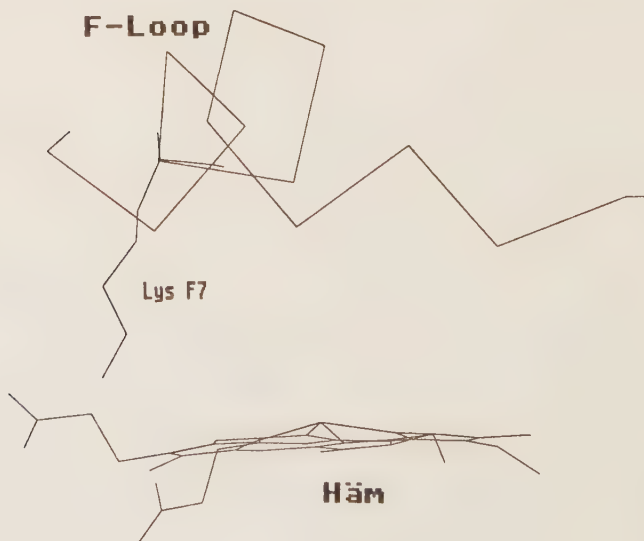


Nummer 4: Hämtasche Mensch Position α CD3 His

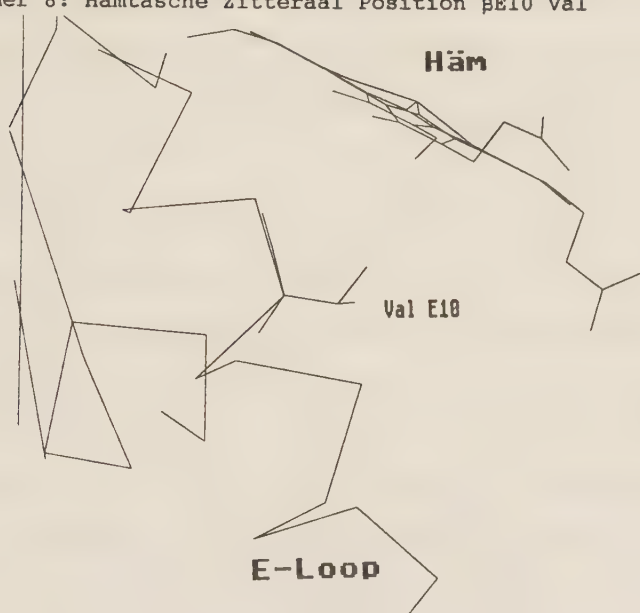


Nummer 5: Hämtasche Zitterrochen Position α CD3 Lys

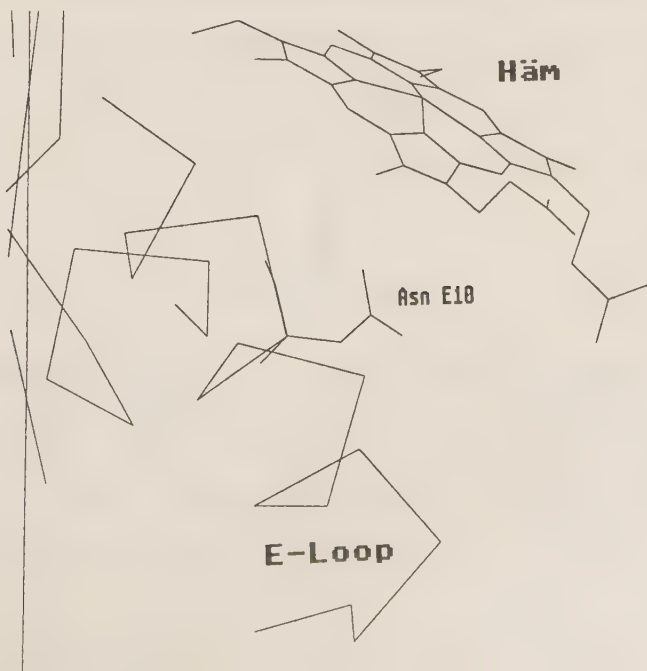


Nummer 6: Hämtasche Mensch Position β F7 LeuNummer 7: Hämtasche Zitterrochen Position β F7 Lys

Nummer 8: Hämtasche Zitteraal Position β E10 Val



Nummer 9: Hämtasche Zitterrochen Position β E10 Asn



Ein Teil der Austausche dürfte sich stabilisierend auswirken (z.B. Leu-->Lys Nr.7, Salzbrücke mit Carboxylgruppen der Propionsäurereste des Häms), ein Teil destabilisierend (z.B. Lys-->Asp Nr.3, Wegfall einer Salzbrücke).

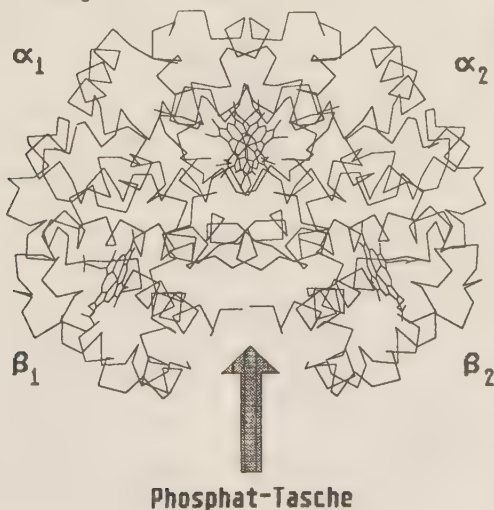
Die Hämoglobine des Zitterrochens sind gegen denaturierende Agentien (z.B. Harnstoff) außerordentlich stabil: so ändert sich die Sauerstoffbeladungskurve selbst in 9 M Harnstofflösung nicht wesentlich (diesen Effekt zeigen alle Knorpelfische!)(⁷⁵). Dies läßt auf eine ungewöhnlich stabile Struktur im Bereich der Hämtaschen schließen.

Alle Hämoglobine der Fische zeichnen sich durch niedrige Dissoziationsneigung aus(⁷⁶); dies bedeutet eine im Vergleich mit den höher entwickelten Hämoglobinen eine erhöhte Anzahl an $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen. Eine Gegenüberstellung dieser Bindungsstellen erscheint auf Grund der geringen Ähnlichkeit in den Primärstrukturen (in Bezug auf menschliches Hämoglobin) als nicht zulässig; als Untergrenze werden mindestens 50% Übereinstimmung gefordert(⁷⁷). In den Ketten von Zitteraal bzw. Zitterrochen wird dieser Wert klar unterschritten.

Effekt organischer Phosphate

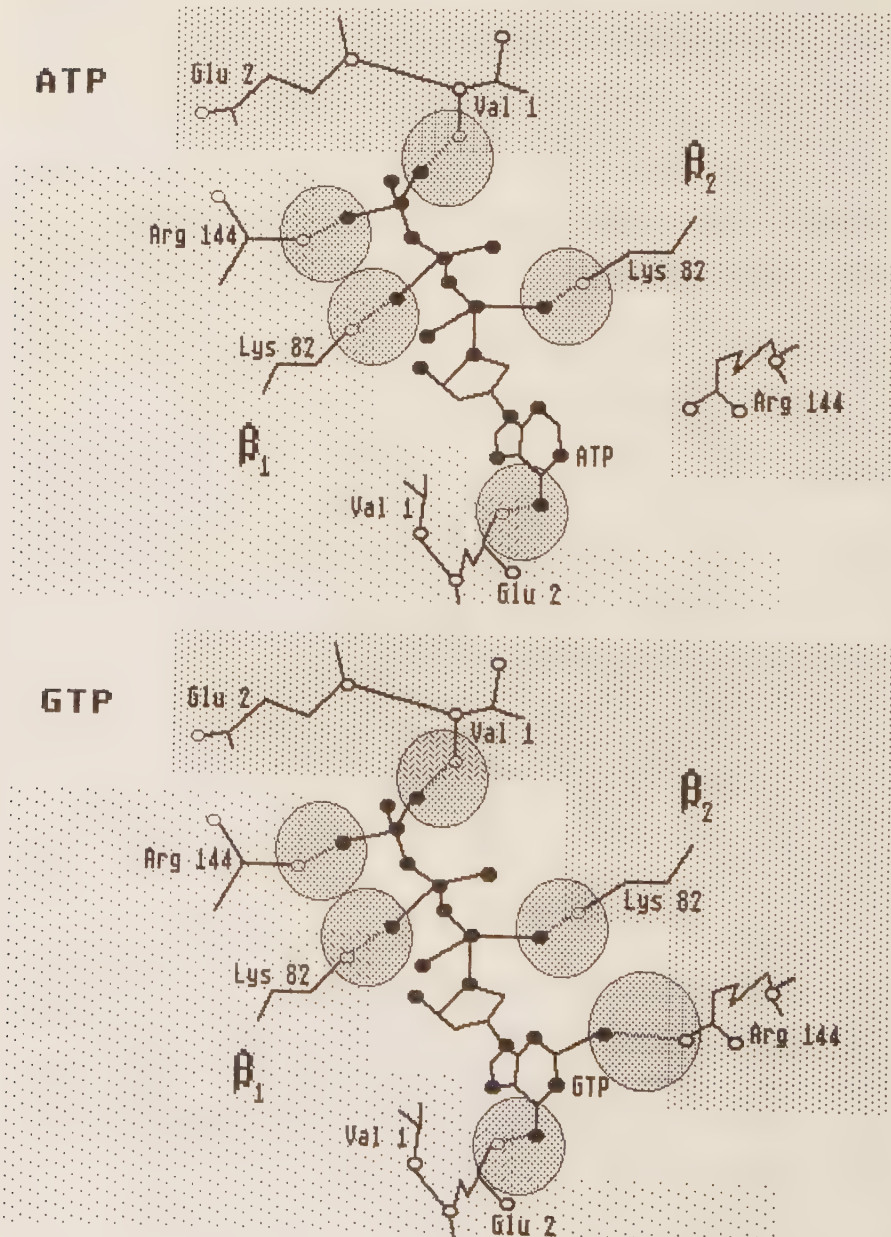
Von besonderem Interesse ist die bei Wirbeltieren auftretende Regulation der Sauerstoffaffinität mittels organischer Phosphate: so benützen die Säuger Diphosphoglycerat (DPG), um in den Zellen die Abgabe von Sauerstoff zu erleichtern^(78,79). Untersuchungen der Struktur ohne bzw. mit DPG im Deoxy-Hämoglobin (nur in der Deoxy-Form wird Phosphat gebunden) lassen als Bindungsort den Spalt erkennen, welcher von der Berührungsfläche der beiden β -Ketten gebildet wird⁽⁸⁰⁾.

Abbildung 23: Hämoglobinmolekül des Menschen (Deoxy-Form)
dargestellt mit FRODO⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾



In Knochenfischen findet man neben Adenosintriphosphat (ATP) vor allem Guanosintriphosphat (GTP) als allosterischen Effektor^(81,82), wobei GTP stärkeren Effekt zeigt als ATP. Mit anderen Worten bedeutet dies die Ausbildung stärkerer Wechselwirkungen mit der T-Form des Hämoglobins.

Abbildung 24: Phosphat-Bindungsstellen im Hämoglobin des Karpfens
(nach M.F. Perutz et al., J.Mol.Biol. 178, 731)



Man sieht, daß ATP mit 5 Aminosäureresten Wasserstoffbrücken bildet, während GTP eine zusätzliche Brücke ausbilden kann.

Tabelle 10: Phosphatbindungsstellen im Hämoglobin von Mensch,
Zitteraal (*Electrophorus electricus*),
Zitterrochen (*Torpedo marmorata*), Hornhai
(*Heterodontus portusjacksoni*)^(83,84)
und Dornenhai (*Squalus acanthias*)⁽⁸⁵⁾.

Position →	NA 1β	NA 2β	EF 6β	H 21β
Human	Val	His	Lys	His
Zitteraal	Val	Glu	Lys	Lys
Torpedo m.	Val	Ser	Asn	Cys
Heterodontus p.	Val	His	Lys	Lys
Squalus a.	Val	His	Lys	Lys

Im Hämoglobin des Zitteraales sind alle Phosphatbindungsstellen vorhanden; im Unterschied zum als Beispiel gewählten Karpfen ist lediglich Arg (Pos. 144β) durch ein Lys ersetzt, was keine Auswirkungen auf die Stabilität der Wasserstoffbrücken haben dürfte. Anders dagegen in den Hämoglobinen des Zitterrochens: hier sind keine Phosphatbindungsstellen zu finden (Ausnahme: Val NA1β).

Ein Vergleich der potentiellen Phosphatbindungsstellen der bis jetzt sequenzierten Knorpelfische (Hornhai, Dornhai und Zitterrochen) zeigt ein erstaunliches Ergebnis: trotz vorhandener Bindungsstellen bei Hornhai und Dornhai zeichnen sich alle bis jetzt untersuchten Knorpelfische durch sehr geringe Effektoraffinitäten aus⁽⁸⁶⁾; mit großer Wahrscheinlichkeit wurden diese Regulationsmechanismen erst im Zuge einer ständig sich weiterentwickelnden Spezialisierung entdeckt und fortentwickelt. Möglicherweise darf auch die Funktion des in den bisher sequenzierten Knorpelfischen fehlenden D-Loops nicht unterschätzt werden: vielleicht dient er als eine Art Gelenk, welches den Spalt zwischen den die Phosphatbindung ermöglichenden beiden β -Ketten auf die ideale Größe bringt. Eine gesicherte Aussage kann erst nach Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse des Hämoglobins eines Knorpelfisches erfolgen.

Evolution

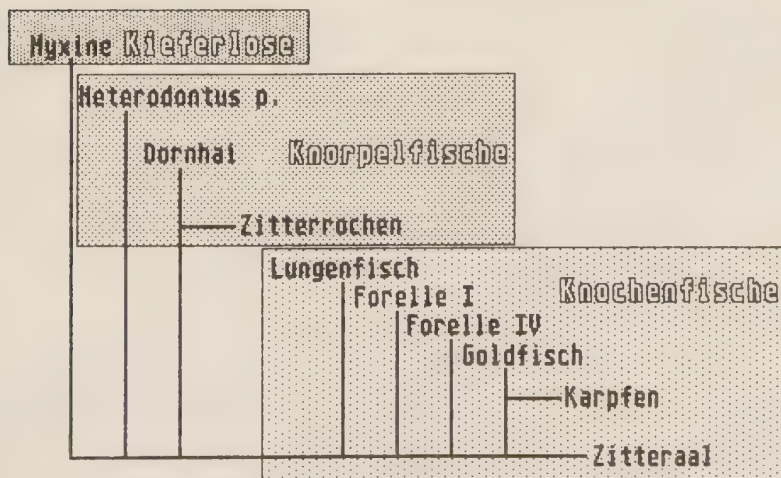
Mit den bisher bekannten Sequenzen der Knorpel- und Knochenfische wurde ein Stammbaum der α - und β -Ketten berechnet. Als Programm wurde das System PHYLIP 3.0 von Felsenstein⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ verwendet, welche alle Substitutionen berücksichtigt, die dem genetischen Code nicht widersprechen⁽⁹⁰⁾. Die resultierenden Stammbäume sind wurzellos; als Basis wurde in allen Fällen die Sequenz des monomeren Hämoglobins der Myxine gewählt, da sie (mit anderen Kieferlosen) als Vorläufer aller Fische betrachtet werden.

Abbildung 25: Stammbaum der Hämoglobine (nur β -Ketten)

der Knorpel- und Knochenfische; als Basis

wird das monomere Hämoglobin der Myxine verwendet

(Programm nach Felsenstein).

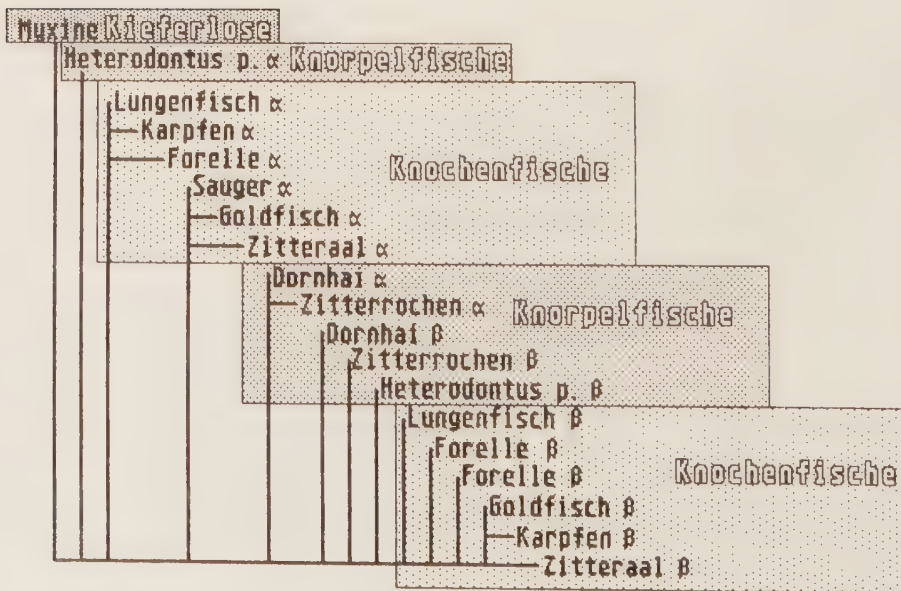


Das Ergebnis fällt aus wie erwartet: die β -Ketten der Knorpelfische zeigen trotz fehlender D-Loops (das Monomere der Myxine besitzt den D-Loop!) einen hohen Grad an Verwandtschaft mit den als lebende Fossilien angesehenen Kieferlosen; erst dann folgen in geschlossener Reihenfolge alle Knochenfische.

In einem weiteren Versuch wurden alle in der Datenbasis gespeicherten α - und β -Ketten der Fische miteinander verglichen:

Abbildung 26: Stammbaum der Hämoglobine (α - und β -Ketten)

der Knorpel- und Knochenfische; als Basis dient wiederum das Monomere der Myxine
(Programm nach Felsenstein).



Hier zeigt sich ein gänzlich unerwartetes Ergebnis: alle α -Ketten der entwicklungsgeschichtlich jüngeren Knochenfische rangieren vor den α - und β -Ketten der Knorpelfische (die Ausnahme Hornhai, *Heterodontus portusjacksoni*, ist mit Fragezeichen zu versehen). Wahrscheinlich eignen sich die α -Ketten aufgrund ihrer Mutationsrate nicht für derartige Berechnungen; ein errechneter Stammbaum der α -Ketten erbrachte das gleiche Ergebnis.

Einleuchtend ist dagegen die Nähe der α - und β -Ketten der Knorpelfische; die β -Ketten ähneln in hohem Maße den als älter eingestuften α -Ketten: sie sind nahezu gleich lang (141 bzw. 142 Aminosäurereste) und zeichnen sich durch das Fehlen der den β -Ketten eigenen D-Loops aus.

Es stellt sich die Frage, ob im Zuge der Evolution schon vorhandene D-Loops in den β -Ketten der Knorpelfische durch Deletionen verloren gegangen sind, oder aber nachträglich sowohl bei Kieferlosen als auch bei Knochenfischen durch Insertionen entstanden sind. Um dieses Problem zu lösen, bedarf es der Ermittlung weiterer Primärstrukturen der Knorpel- und Knochenfische.

Zusammenfassung

Die Primärstruktur der Hämoglobine des Zitteraales (*Electrophorus electricus*) und des Zitterrochen (*Torpedo marmorata*) wurden aufgeklärt. Das Hämoglobin des Zitteraales enthielt nur eine Komponente, das Hämoglobin des Zitterrochen zeigte eine Vielzahl an Komponenten, welche sich als nicht trennbar erwiesen. Ebenso war es trotz Einsatz neuartiger Puffergemische nicht möglich, diese verschiedenen α - bzw. β -Ketten voneinander zu trennen; die α - bzw. β -Ketten des Zitterrochen wurden deshalb zusammen sequenziert.

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion wird diskutiert: insbesondere das Fehlen des für Knochenfische charakteristischen Root-Effektes trotz vorhandener Bindungsstellen im Hämoglobin des Zitteraales; die Abwesenheit des Bohr-Effektes und der allosterischen Regulation mittels organischer Phosphate im Hämoglobin des Zitterrochen lässt sich anhand der substituierten Aminosäuren erklären.

Die hohe Stabilität der Fisch-Hämoglobine wird am Beispiel der ausgetauschten Hämbindungsstellen unter Zuhilfenahme des Computerprogrammes FRODO illustriert. Mit dem Programm PHYLIP werden die Sequenzdaten zu einem Stammbaum der Fische zusammengestellt.

Ein neues Puffersystem für Gasphasensequenzierung wird etabliert.

Literatur

- (1) Reichenbach-Klinke H.,
(1970) Grundzüge der Fischkunde.
- (2) Cannan R.K.,
(1961) Science 127, 1376-1378.
- (3) Huber F., Diplomarbeit.
- (4) Rossi-Fanelli A., Antonini E.,
(1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 608-615.
- (5) Teale F.W.J.,
(1959) Biochim. Biophys. Acta 35, 543.
- (6) Clegg G.B., Naughton M.A., Weatherall D.J.,
(1966) J. Mol. Biol. 19, 91-108.
- (7) Huber F., Diplomarbeit.
- (8) Davis B.J.,
(1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- (9) Rovera G., Magarian C., Borun T.W.,
(1978) Anal. Biochem. 85, 506-518.
- (10) Weber K., Osborn M.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- (11) Moffat E.D., Lyle R.F.,
(1959) Anal. Chem. 31, 926.
- (12) Frank H., Petersen H.,
(1955) Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler 299, 1.
- (13) Gottlieb A.J., Itano H.A.,
(1963) Bioc. Biop. R. 12, 405.
- (14) Dagliesh C.E.,
(1952) Biochem. J. 52, 3.
- (15) Guidotti G., Hill R.J., Konigsberg W.,

- (1962) J. Biol. Chem. 237, 2184.
- (16) Houmard J., Drapeau G.R.,
(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3506.
- (17) Jauregui-Adell J., Marti J.,
(1975) Anal. Biochem. 69, 468.
- (18) Butler P.J.G., Harris J.I., Hartley B.S., Leberman R.,
(1969) Biochem. J. 112, 679.
- (19) Mahoney W.C., Hermodson M.A.,
(1979) Biochemistry 18, 3810.
- (20) Steers E.Jr., Craven G.R., Anfinsen G.B., Bethune J.L.,
(1965) J.Biol. Chem. 240, 2478.
- (21) Kratzin H., Yang C., Krusche J.U., Hilschmann N.,
(1980) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 1591.
- (22) Spackman D.H., Stein W.H., Moore S.,
(1958) Anal. Chem. 30, 1190.
- (23) Matsubara H., Sasaki R.M.,
(1969) Biochim. Biophys. Res. Commun. 35, 175.
- (24) Edman P., Begg G.,
(1967) Eur. J. Biochem. 1, 80.
- (25) Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A., Petersen S.,
Petersen U.,
(1971) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 1730.
- (26) Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Scheithauer U.,
(1978) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 137.
- (27) Pflutschinger J., Braunitzer G.,
(1980) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 925.
- (28) Braunitzer G., Schrank B.,
(1970) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 417.

- (29) Zimmermann C.L., Pisano J.J.,
(1977) Meth. Enzymol. 47, 45.
- (30) Lottspeich F.,
(1980) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 1829.
- (31) Begg G., Rücknagel P., Braunitzer G., Schuster W.,
(1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 81.
- (32) Hunkapiller M.W., Hewick R.M., Dreyer W.J., Hood L.E.,
(1983) Meth. Enzymol. 91, 399.
- (33) Braunitzer G., Huber F.,
(1987) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 195.
- (34) Schäfer W.,
(1983) Mod. Meth. Prot. Chem., 337.
- (35) Svedberg T., Pederson K.O.,
(1940) Oxford University Press.
- (36) Wald G., Riggs A.,
(1951) J.Gen.Physiol. 35, 45.
- (37) Briehl R.W.,
(1963) J.Biol.Chem. 238, 2361.
- (38) Perutz M.F.,
(1983) Mol.Biol.Evol. 1, 1.
- (39) Love W.E., Klock P.A., Lattman E.E., Padlan E.A.,
Ward K.B., Hendrickson W.A.,
(1971) Symp.Quant.Biol. 36, 349.
- (40) Hombrados I., Rodewald K., Neuzil E., Braunitzer G.,
(1983) Biochemie 65, 247.
- (41) Grzimek B.,
Grzimeks Tierleben 4, Fische 1, 124.
- (42) Steen J.B.,

- in Hoar W.S., Randall D.J., Brett J.R., Ed.,
(1979) Fish Physiology 4, 413.
- (43) Herald S.,
(1961) Knaurs Tierreich in Farben, Band Fische, 54.
- (44) Riggs A., in Hoar W.S., Randall D.J., Ed.,
(1970) Fish physiology 4, 209.
- (45) Johansen K., Weber R.W., in Davis P.S., Ed.,
(1976) Perspectives in biology 1, 219.
- (46) Grzimek B.,
Grzimeks Tierleben 4, Fische 1, 312.
- (47) Herald S.,
(1961) Knaurs Tierreich in Farben, Band Fische, 121.
- (48) Johansen K. in Hoar W.S., Randal D.J., Ed.,
(1970) Fish Physiology, 4, 187.
- (49) Rahn H.,
(1966) Resp.Physiol., 1, 1.
- (50) Johansen K., Lenfant C., Schmidt-Nielsen K.,
Petersen J.A.,
(1968) Z.Vergl.Physiol. 61, 137.
- (51) Root R.,
(1931) Biol.Bull. 61, 427.
- (52) Monod J., Wyman J., Changeaux J.P.,
(1985) J.Molec.Biol. 88.
- (53) Scholander P.V., Van Dam L.,
(1954) Biol.Bull.mar.Biol.Lab.Woods Hole. 107, 247.
- (54) Gille R.G., Riggs A.,
(1972) J.Biol.Chem. 247, 6039.
- (55) Tan A.L., Noble R.W., Gibson Q.H.,

- (1973) J.Biol.Chem. 248, 2880.
- (56) Grujic-Injac B., Braunitzer G., Stangl A.,
(1980) Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 361, 1629.
- (57) Parkhurst L.J., Goss D.J., Perutz M.F.,
(1983) Biochemistry 22, 512.
- (58) Bossa F., Barra D., Petruzzelli R., Martini F.,
Brunori M.,
(1978) Biochim.Biophys.Acta 536, 298.
- (59) Barra D., Petruzzelli R., Bossa F., Brunori M.,
(1983) Biochim.Biophys.Acta 742, 72.
- (60) Brittain T.,
(1987) Comp.Biochem.Physiol. 86, No. 3, 473.
- (61) Rodewald K., Stangl A., Braunitzer G.,
(1984) Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 365, 639.
- (62) Morris R.J., Gibson Q.H.,
(1981) J.Biol.Chem. 256, 8050.
- (63) Reichenbach-Klinke H.,
(1970) Grundzüge der Fischkunde, Gustav Fischer Verlag.
- (64) Nagai K., Perutz M.F., Poyart C.,
(1985) Proc.Natl.Acad.Sci. 82, 7252.
- (65) Bohr C., Hasselbalch K., Krogh A.,
(1904) Skand.Arch.Physiol. 16, 402.
- (66) Henderson L.J.,
(1920) J.Biol.Chem. 41, 401.
- (67) Perutz M.F., Kilmartin J.V., Nishikura K.,
Fogg J.H., Butler P.J.G.,
(1980) J.Mol.Biol. 138, 649.
- (68) Brunori M.,

- (1975) Current Topics Cell.Regulation 9, 1.
- (69) Perutz M.F., Del Pulsinelli P., Ten Eyck L.,
Kilmartin J.V., Shibata S., Iuchi I.,
Miyaji T., Hamilton H.B.,
(1971) Nature New Biology 232, No. 31, 147.
- (70) Lesk A.M., Chothia C.,
(1980) J.Mol.Biol. 136, 225.
- (71) Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B.,
Meyer E.F., Price M.D., Rogers J.R., Kennard O.,
Shimanouchi T., Tasumi M.,
(1977) J.Mol.Biol. 112, 535.
- (72) Abola E.E., Bernstein F.C., Bryant S.H., Koetzle T.F.,
Weng J., Allen F.H., Berghoff G., Sievers R., Eds.,
(1987) Data Commission of the International
Union of Crystallography, Bonn/Cambridge/Chester, 107.
- (74) Fermi G., Perutz M.F., Shaanan B., Fourme R.,
(1984) J.Mol.Biol. 175, 159.
- (75) Bonaventura J., Bonaventura C., Sullivan B.,
(1974) Science 186, 57.
- (76) Brunori M., Giardina B., Chiancone E.,
Spagnuola C., Binotti I., Antonini E.,
(1973) Eur.J.Biochem. 39, 563.
- (77) Chothia C., Lesk A.,
(1986) Embo J. 5(4), 823.
- (78) Chanutin A., Curnish R.R.,
(1967) Archs.Biochem.Biophys. 121, 96.
- (79) Benesch R., Benesch R.E.,
(1967) Biochem.Biophys.Res.Comm. 26, 162.

- (80) Perutz M.F., Brunori M.,
(1982) *Nature* 299, 421.
- (81) Weber R., Lykkeboe G., Johansen K.,
(1975) *Life Sci.* 17, 1345.
- (82) Weber R., Lykkeboe G., Johansen K.,
(1976) *Exp.Biol.* 64, 75.
- (83) Fisher W.K., Nash A.R., Thompson E.O.P.,
(1977) *Australian J.Biol.* 30, 487.
- (84) Nash A.R., Fisher W.K., Thompson E.O.P.,
(1976) *Australian J.Biol.Sci.* 29, 73.
- (85) Aschauer H., Weber R.E., Braunitzer G.,
(1985) *Biol.Chem. Hoppe-Seyler* 366, 589.
- (86) Grigg G.C.,
(1972) *Chem.Zoology* 8, 331.
- (87) Felsenstein J.,
(1978) *Syst.Zool.* 27, 27.
- (88) Felsenstein J.,
(1981) *J.Molec.Evol.* 17, 368.
- (89) Felsenstein J.,
(1982) *Quart.Rev.Biol.* 57, 379.
- (90) Sgouros J.,
(1988) *Dissertation*, 70.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Zeit von November 1985 bis September 1988 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer danke ich für die Ermöglichung der Arbeit, die Bereitstellung des interessanten Themas und die ständige Gesprächsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Mälicke, Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in Dortmund, sowie Herrn Prof. Dr. Whittacker, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, für die Beschaffung von Erythrozyten des Zitteraal bzw. Zitterrochen.

Viele Anregungen verdanke ich Frau Dr. T. Kleinschmidt, Frau Dr. K. Rodewald, Herrn Dr. P. Rücknagel und Herrn Dr. J. Sgouros; letzterem gebührt wegen seiner unerschöpflichen Geduld als Mittler zwischen den diversen Computerprogrammen und mir besonderer Dank.

Für die technische Unterstützung bin ich Frau B. Bless, Fräulein R. Gautsch, Frau A. Muhr, Herrn R. Mentele, Frau B. Schrank und Frau E. Wottawa Dank schuldig.

Für die Durchsicht meiner Arbeit, für manchen guten Rat-schlag und für ihre verständnisvolle Anteilnahme danke ich meiner Frau.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Lebenslauf

Felix Ferdinand Jakob Huber

6.12.1957 Geburt in Bad Tölz/Oberbayern;
16.4.1987 Eheschließung mit Korinna Huber, geb. Mannheim.

Ausbildung

1964-1968 Besuch der Grundschule Waltenhofen im Allgäu;
1968-1977 Besuch des Allgäu-Gymnasiums in Kempten;
Juni 1977 Allgemeine Hochschulreife;
7/77-10/78 Ableistung des Wehrdienstes in Sonthofen;
11/78-9/81 Studium der Chemie an der Technischen Universität
 in München;
10/81-11/84 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität
 in München;
11/84 Absolvierung der Diplomprüfung;
1/85-10/85 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie,
 Abteilung Proteinchemie, Leitung: Prof.Dr. G. Braunitzer;
seit 11/85 Doktorand in der Abteilung Proteinchemie, Max-Planck-
 Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter
 Anleitung von Herrn Prof.Dr. G.Braunitzer.

